

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Institut für Ernährungswissenschaften
Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie



Entwicklung einer Methode für die *in vitro* Fermentation von Nahrungsbestandteilen und Untersuchungen zur Charakterisierung der Fermentationsprodukte

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades eines
Diplom-Ernährungswissenschaftlers
(Dipl.troph.)

vorgelegt von

Axel Weber

geboren am 06.07.1981 in Erfurt

Jena, im Juli 2007

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Beatrice L. Pool-Zobel

Zweiter Gutachter: PD Dr. Michael Gle

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Gleichungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Krebs und Ernährung	1
1.2 Grundlagen der Kolonkarzinogenese.....	3
1.3 Ökosystem Dickdarm	7
1.3.1 Präbiotika und Probiotika.....	9
1.3.2 Intestinale Fermentation	10
1.4 In vitro Fermentation:	13
1.5 Ziele der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Zelllinien.....	20
2.1.2 Testsubstanzen	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkultur	21
2.2.2 Fermentation.....	22
2.2.3 Messung des Fett- & Gallensäuregehaltes	26
2.2.4 Messung des Ammoniakgehaltes.....	27
2.2.5 Messung der akuten Zytotoxizität.....	29
2.2.6 Messung der Proliferation kultivierter Zellen (DAPI-Assay)	29
2.2.7 Messung der metabolischen Aktivität kultivierter Zellen (CTB-Assay).....	31
2.2.8 Messung genotoxischer Schäden (Comet Assay)	32
2.2.9 Statistik	34
3 Ergebnisse	35
3.1 pH-Werte der Fermentationssuspensionen.....	35
3.2 Fett- & Gallensäuregehalt der Fermentationsüberstände	36

3.2.1 Kurzkettige Fettsäuren (SCFA)	36
3.2.2 Gallensäuren (GS).....	41
3.3 Ammoniakgehalt der Fermentationsüberstände	42
3.4 Einfluss der Fermentationsüberstände auf die Proliferation und	
metabolische Aktivität kultivierter Kolonkarzinomzellen	43
3.4.1 Proliferation.....	43
3.4.2 Metabolische Aktivität	51
3.5 Induktion genotoxischer Schäden durch die Fermentationsüberstände	55
4 Diskussion	57
4.1 Veränderung des pH-Wertes durch die Fermentation.....	58
4.2 Bildung von Fermentationsprodukten & Metaboliten.....	59
4.2.1 kurzkettige Fettsäuren (SCFA)	59
4.2.2 Gallensäuren (GS).....	61
4.2.3 Ammoniak	63
4.3 Modifikation des Wachstums und des Metabolismus von HT29-Zellen	
durch die Testsubstanzen.....	65
4.3.1 Beeinflussung der Zellproliferation	66
4.3.2 Beeinflussung der metabolischen Aktivität.....	69
4.4 Genotoxische Schadwirkung der Testsubstanzen	71
4.5 Fazit	72
5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	73
6 Literaturverzeichnis	76
7 Anlagen	88
7.1 Zusammensetzung der Fermentationsmedien.....	88
7.2 verwendete Testsubstanzen	89
7.3 Geräte	91
7.4 Arbeitsmittel	92
7.5 Chemikalien und Reagenzien	93
7.6 Lösungen und Puffer.....	94
7.7 Software.....	98
7.8 Technische Daten der SCFA- & GS-Quantifizierung	98

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Prozentualer Anteil der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in Dtl.	3
Abb. 1-2: Aufbau des Kolonepithels mit Kolonkrypte	4
Abb. 1-3: Mehrstufenmodell der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms	6
Abb. 1-4: one-batch- <i>in vitro</i> -Fermentation	14
Abb. 1-5: Schematische Darstellung eines kontinuierlichen Fermentationssystems in 3	
aufeinanderfolgenden Reaktionsgefäßen	14
Abb. 1-6: Schematische Darstellung des SHIME-Modells nach Molly et al. [1993].....	16
Abb. 2-1: Ammoniumchlorid-Standardreihe (Indophenol-Reaktion)	28
Abb. 3-1: SCFA-Konzentrationen der Fermentationsüberstände Inulin	37
Abb. 3-2: SCFA-Konzentrationen der Fermentationsüberstände AS05	38
Abb. 3-3: SCFA-Konzentrationen der Fermentationsüberstände WK	39
Abb. 3-4: Gallensäuregehalt der Fermentationsüberstände	41
Abb. 3-5: Ammoniakkonzentration der Fermentationsüberstände	43
Abb. 3-6: Proliferationsergebnis – Fermentationsüberstände Inulin.....	45
Abb. 3-7: Proliferationsergebnis – Fermentationsüberstände AS05.....	46
Abb. 3-8: Proliferationsergebnis – Fermentationsüberstände WK.....	47
Abb. 3-9: Proliferationsergebnis – Fermentationsmedien.....	49
Abb. 3-10: Proliferation und metabolische Aktivität im Vergleich – „Blank“	51
Abb. 3-11: Proliferation und metabolische Aktivität im Vergleich – „Inulin“	52
Abb. 3-12: Proliferation und metabolische Aktivität im Vergleich – „AS05“	53
Abb. 3-13: Proliferation und metabolische Aktivität im Vergleich – „WK“	53
Abb. 3-14: Ergebniss Comet Assay	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: wichtige in vitro Fermentationstechniken und ihre Anwendungsbereiche	17
Tabelle 2-1: Messparameter der fluoreszenzphotometrischen Auswertung (DAPI-Assay)...	30
Tabelle 2-2: Messparameter der fluoreszenzphotometrischen Auswertung (CTB-Assay)	32
Tabelle 3-1: pH-Werte der Fermentationssuspensionen	35
Tabelle 3-2: Vergleich des SCFA-Gehaltes der Fermentationsüberstände nach Subtraktion .. des dazugehörigen Blank-Wertes	40
Tabelle 3-3: EC ₅₀ -Werte der Fermentationsüberstände	48
Tabelle 3-4: Proliferationsergebnis der Positivkontrolle (Butyrat)	49
Tabelle 3-5: signifikante Unterschiede zwischen den Proliferationsergebnissen der	
Fermentationsmedien	50
Tabelle 3-6: EC ₅₀ -Werte der Fermentationsmedien	50
Tabelle 3-7: relative metabolische Aktivität der Fermentationsüberstände	55
Tabelle 4-1: Zusammenfassung der pH-Werte und der Fermentationsprodukte &	
-metabolite aller Fermentationsüberstände	65
Tabelle 7-1: AS05-Polyphenolzusammensetzung	89
Tabelle 7-2: AS05-Saccharidzusammensetzung	90
Tabelle 7-3: WK-Zusammensetzung	90
Tabelle 7-4: Technische Daten der GC (SCFA-Quantifizierung)	98
Tabelle 7-5: Technische Daten der GC-MS (GS-Quantifizierung)	99

Gleichungsverzeichnis

Gleichung 2-1: Berechnung der Zellzahl	21
Gleichung 2-2: Berechnung der Vitalität	22
Gleichung 3-1: Bestimmung der relativen metabolischen Aktivität	54

Abkürzungsverzeichnis

96 MTP	96-Well-Mikrotiterplatte
A	Amper
Abb.	Abbildung
AFM	alte Fermentationsmethode
APC	Tumorsuppressorgen (adenomatous polyposis coli)
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Bar	Einheit des Drucks
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CTB	CellTiterBlue - Reagenz
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindol
DCA	Deoxycholsäure
Dtl.	Deutschland
EGF	epidermal growth factor
FCS	fötales Kälberserum
FSU	Friedrich Schiller Universität Jena
FM	Fermentationsmethode
FS	Fermentationssuspension
FÜ	Fermentationsüberstand
FW	Faeceswasser
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GIT	Gastrointestinaltrakt
GS	Gallensäuren
h	Stunde
HT29	kultivierte Krebszelllinie des Dickdarms
HCL	Salzsäure
int. Ext.	gastrointestinales Extrakt

L	Liter
LMA	low melting agarose
m	milli (10^{-3})
m	Meter
m/m	Masseprozent (mass per mass)
min	Minute
Mio	Million
MW	Mittelwert
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NFM	neue Fermentationsmethode
Nm	Nanometer
NMA	normal melting agarose
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
p53	Tumorsuppressorgen
RAS	Protoonkogen
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)
SD	Standardabweichung
SHIME	Simulator of the human intestinal microbial ecosystem
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehung pro Minute
usw.	und so weiter
V	Volt
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZZ	Zellzahl

Abstract

Introduction: The *in vitro* fermentation is an appropriate tool for observing and analyzing physiological effects of food compounds in the large intestine. The aim of the present work was to modify the one-batch-*in vitro*-fermentation method from Barry et al. [1995] ("old" fermentation method – OFM) with a previous simulation of the processes of the upper digestive tract to adapt the system to *in vivo* conditions ("new" fermentation method – NFM). Fermentation supernatants were collected, chemically and biologically characterized and compared. **Methods:** The fermentation methods were carried out at the same time with test substances from plant foods. Fresh human faeces were collected from three healthy volunteers and were used in equal portions for both methods. The OFM lasted 24 h at 37°C and under anaerobic conditions using an anaerobic potassium phosphate buffer for the dilution of test substances and inoculum. The additional upper digestive tract simulation of the NFM, with the observance of an organ-specific duration of simulation, the addition of pancreatic and bile liquid ("intestinal extract"), the regulation of organ-specific luminal conditions (pH-value, oxygen atmosphere) and the use of a growth medium based on practices Molly et al. [1993] developed in a multi-stage continuous culture system (SHIME-Model). Upon completion of the fermentation resulting pH-values were measured and supernatants were obtained. Short chain fatty acid (SCFA) and bile acid concentrations were determined gas chromatographically as well as ammonia concentrations by a chemical photometric method. The modification of cell growth and metabolism of human colon carcinoma cells (HT29) by the supernatants were analyzed with the DAPI- and CTB-Assay, while the induction of genotoxic damage was analyzed with the comet assay. **Results:** The fermentation of the test substances according to the NFM resulted in decreased pH-values with 2-3 fold higher concentrations of SCFA and ammonia but with smaller differences to the blank control compared to the OFM. Because of the addition of the "intestinal extract" there were high amounts of bile acids in the supernatants from the NFM with test substance-dependent varieties in secondary bile acid formation. The incubation of the HT29-cells with supernatants from the NFM resulted in a stronger inhibition of cell growth and metabolism as well as a stronger induction of genotoxic damage compared to supernatants from the OFM. However the results achieved by the test substances of the OFM showed thereby a stronger effect in relation to the blank control compared with the test substances of the NFM, which partially could obtain no additive effects in the comparison to the blank control. **Conclusions:** A previous simulation of the upper digestive tract is important to adapt the *in vitro* fermentation system to *in vivo* conditions, especially for the investigation of complex foods, and can help understanding the processes of the colon. Thus for example the addition of the "intestinal extract" enables the analysis of secondary bile acid formation by the gut flora as a function of test substance fermentation. Due to the fast execution of a one-batch-*in vitro*-fermentation, with the observation of test substance-dependent effects during one period of 24 h, the use of a growth medium with additionally fermentable components proved as rather unfavorably, particularly for investigations in cellular test systems. Finally the use of the media aggravated the equation of both methods, why the influence of an additional simulation of the stomach and the small intestine couldn't be evaluated. Therefore the future performance of the NFM should take place with a component-poor medium or salt buffer.

Einleitung: Die *in vitro* Fermentation ist ein geeignetes Hilfsmittel für die Analyse von Nahrungsmittelinhaltsstoffen hinsichtlich ihrer physiologischen Effekte im Dickdarm. Ziel dieser Arbeit war es, die one-batch-*in vitro*-Fermentation nach Barry et al. [1995] (alte Fermentationsmethode – AFM) durch eine vorherige Simulation der Prozesse des oberen Verdauungstraktes zu modifizieren (neue Fermentationsmethode – NFM), um eine Anpassung an die *in vivo* Bedingungen zu erreichen. Gewonnene Fermentationsüberstände (FÜ) wurden chemisch und biologisch charakterisiert und anschließend miteinander verglichen. **Methoden:** Die Fermentationsmethoden wurden parallel, mit Komponenten pflanzlicher Nahrungsmittel als Testsubstanzen durchgeführt. Es wurden frische Faecesproben von jeweils 3 gesunden Spendern gesammelt und zu gleichen Teilen für die beiden Methoden verwendet. Die 24-stündige AFM wurde bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Als Fermentationsmedium diente ein anaerober Kaliumphosphatpuffer. Die zusätzliche Simulation der Verdauungsprozesse des Magens und Dünndarms, mit der Einhaltung einer organspezifischen Simulationsdauer, der Addition eines Verdauungsekretes und der Einstellung eines entsprechenden Milieus (pH-Wert, O₂-Atmosphäre), erfolgte in Anlehnung an das von Molly et al. [1993] entwickelte, kontinuierliche *in vitro* Fermentationssystem (SHIME-Modell) unter Verwendung eines Nährmediums. Nach Beendigung der Fermentation wurden die pH-Werte der Suspensionen gemessen und die FÜ gewonnen. Mittels Gaschromatographie erfolgte die Konzentrationsbestimmung kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) und Gallensäuren (GS) sowie chemisch-photometrisch die Bestimmung der Ammoniakkonzentration. Die Modifikation des Wachstums und des Metabolismus humaner Kolonkarzinomzellen (HT29), nach Inkubation mit den FÜ, wurde mit dem DAPI- & CTB-Assay sowie die Induktion genotoxischer Schäden, nach Inkubation mit den FÜ, mit dem Comet Assay bestimmt. **Ergebnisse:** Die Fermentation der Testsubstanzen nach Durchführung der NFM führte gegenüber der AFM zu niedrigeren pH-Werten mit doppelt bis dreifachen SCFA- und Ammoniakkonzentrationen, welche im Vergleich zum Blank jedoch geringere Unterschiede zeigten. Die Addition des intestinalen Extraktes führte zu erhöhten GSgehalten in den nach der NFM gewonnenen FÜ, welche testsubstanzabhängige Unterschiede in der Menge gebildeter, sekundärer GS aufwiesen. Die Inkubation der HT29-Zellen mit FÜ der NFM führte zu einer stärkeren Inhibierung des Wachstums und des Metabolismus sowie zu einer Steigerung der genotoxischen Schädigung. Im Vergleich zum Blank, erzielten die nach Durchführung der AFM gewonnenen FÜ allerdings einen z.T. deutlich stärkeren Effekt als die FÜ der NFM. **Schlussfolgerungen:** Für die Anpassung von *in vitro* Fermentationssystemen an *in vivo* Bedingungen ist eine vorherige Simulation des oberen Verdauungstraktes, v.a. bei der Untersuchung komplexer Lebensmittel, von hoher Bedeutung. Prozesse des Kolons können dadurch besser untersucht und verstanden werden. So ermöglichte z.B. die Addition des intestinalen Extraktes eine Analyse der Bildung sekundärer GS durch eine testsubstanzabhängige Steigerung der Darmfloraaktivität. Aufgrund der schnellen Durchführung einer one-batch-*in vitro*-Fermentation, mit der Beobachtung testsubstanzabhängiger Effekte über einen Zeitraum von 24h, erwies sich die Verwendung eines Nährmediums mit zusätzlich fermentierbaren Komponenten, v.a. für Untersuchungen in zellulären Testsystemen, als eher nachteilig. Zusätzlich erschwerte es den Vergleich mit den nach der AFM gewonnenen FÜ, weshalb sich Effekte einer zusätzlichen Simulation der Prozesse des oberen Verdauungstraktes nur bedingt feststellen ließen. Daher sollte zukünftige die Durchführung der NFM mit einem komponentenarmen Zellkulturmedium oder Salzpuffer erfolgen.

1 Einleitung

1.1 Krebs und Ernährung

Krebs ist im allgemeinen Sprachgebrauch ein Sammelbegriff für eine Vielzahl verwandter Krankheiten, bei denen teilungsfähige Zellen des Körpers unkontrolliert wachsen und gesundes Gewebe verdrängen und zerstören können. Krebs hat unterschiedliche Auslöser, die letztlich alle zu einer Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus (Wachstum und Teilung) und Zelltod (Apoptose) führen. Entziehen sich die Zellen des Organismus bzw. eines Gewebes ihrer Wachstumsregulation, geben sie das dafür verantwortliche fehlerhafte Genom an die Tochterzellen weiter und Tumore können entstehen [Alberts, 2002].

Die Krebserkrankung hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte, neben Erkrankungen des Herz-Kreislauf- und Atmungssystems, als eine der Haupttodesursachen der Bevölkerung moderner Industriestaaten herauskristallisiert und dadurch große Bedeutung in den Bereichen der Toxikologie, Biochemie und Humanmedizin erlangt [Boyle & Ferlay, 2005]. Die stetige Verbesserung der Nahrungsmittelproduktion und –versorgung sowie des medizinischen und hygienischen Standards führte zu einem Rückgang infektiöser und parasitärer Krankheiten (in Entwicklungsländern nachwievor Todesursache Nr.1 [WHO, 2006]), weshalb heute der individuelle Lebensstil maßgeblich an der Beeinflussung des Gesundheitszustandes im Zusammenhang mit dem Auftreten degenerativer Erkrankungen beteiligt ist. Im Schnitt erkranken in Deutschland jährlich etwa 400.000 Personen neu an Krebs. Über 200.000 Patienten versterben an den Folgen ihrer Erkrankung [Robert Koch Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2006]. Europaweit stellt Krebs sowohl bei Männern als auch bei Frauen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation steigt die weltweite jährliche Zahl an Krebsneuerkrankungen von momentan etwa 10 Millionen auf 15 Millionen bis zum Jahr 2020 an [Meyenfeldt, 2005; WHO, 2003]. In Deutschland spielen Krebserkrankungen des Dickdarms (Kolon) oder Mastdarms (Rectum), zusammen auch als kolorektales Karzinom bezeichnet, mit jährlich über 32.000 Fällen bei Männern und 34.000 bei

Frauen [Präventionsratgeber Ernährung; Dife & DGE 2005] eine enorm wichtige Rolle bei der Zahl der Krebsneuerkrankungen.

Das Darmepithel zählt neben dem Haut- und Lungenepithel zu den größten Grenzflächen unseres Organismus mit der Umwelt und ist täglich einer Exposition unterschiedlichster, durch die Nahrung aufgenommener Substanzen ausgesetzt. Eine Reihe von Schutzmechanismen, z.B. Mucosaschutz durch mukusproduzierende Zellen, pH-Wert des Magens, Darmperistaltik oder sekretorische Immunglobuline, verhindern das Aufnehmen von Mikroben oder pathogenen Keimen und ermöglichen, dass neben den essentiellen Nahrungsbestandteilen nur geringe Mengen körperfremder Stoffe (mit antigenen Strukturen) bzw. Schadstoffe die Epithelgrenze passieren [Silbernagl & Despopoulos, 2001]. Werden Schadstoffe trotz alldem durch das Darmepithel aufgenommen, verfügen die Zellen über ein internes Entgiftungssystem. Enzyme des Phase I & II –Fremdstoffmetabolismus dienen der Exkretion von Schadstoffen, wobei eine beschleunigte Entgiftung v.a. durch Phase II-Enzym katalysierte Konjugationsreaktionen realisiert wird [Marquardt & Schäfer, 2004].

Hinsichtlich der Ausbildung einer Darmkrebserkrankung können sich Nahrungsbestandteile bzw. deren Spaltprodukte durch Interaktion mit z.B. DNA, Rezeptorproteinen oder Enzymen der Epithelzellen sowohl krebsfördernd, wenn deren toxisches Potential nicht ausreichend eliminiert werden konnte, als auch krebspräventiv verhalten (z.B. Induktion von Phase II-Enzymen) [Hanahan & Weinberg, 2000]. Aromatische und heterozyklische Amine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine oder Lipidperoxidationsprodukte sind Beispiele für Stoffklassen denen ein kanzerogenes Potential zugeschrieben wird und welche vor allem in tierischen Lebensmitteln vorkommen [Rojas et al., 2000; Sachse et al., 2002; Turesky, 2002]. Zu den krebspräventiven Nahrungsmittelinhaltsstoffen zählen insbesondere die Vertreter der sekundären Pflanzenstoffe wie Tannine, Flavonoide, andere phenolische Verbindungen oder Terpene [Le Marchand, 2002; Veeriah et al., 2006]. Solche Stoffe tragen unter anderem durch ihre antioxidative Aktivität gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zum Schutz von Zelle und DNA bei [Collins, 1999; Chen et al., 2001]. Die für die intestinalen Enzyme des Menschen fast ausschließlich unverdaubaren und somit unverwertbaren Ballaststoffe, welche vorwiegend als faserige Zellwandbestandteile in pflanzlichen Nahrungsmitteln

vorkommen, können durch die Bindung toxisch wirkender Nahrungsbestandteile und Gallensäuren im Darmlumen deren Interaktion mit den Epithelzellen verhindern und dadurch ein Krebsrisiko minimieren [Ferguson & Harris, 1999a].

Bedingt durch einen hohen Fleisch- und Fettverzehr und einer geringen Aufnahme pflanzlicher Nahrungsmittel, wie Obst, Gemüse oder Getreideprodukten, wird die in den westlichen Industrieländern verbreitete, sogenannte „Western style diet“, neben Zivilisationskrankheiten wie Arteriosklerose, mit einem erhöhten Auftreten von Darmkrebs in Verbindung gebracht [Berlau, 2004; Divisi et al., 2006]. Das kolorektale Karzinom stellt sowohl bei der Frau als auch beim Mann die zweithäufigste Krebsart bei den jährlichen Krebsneuerkrankungen in Deutschland dar (Abb. 1-1).

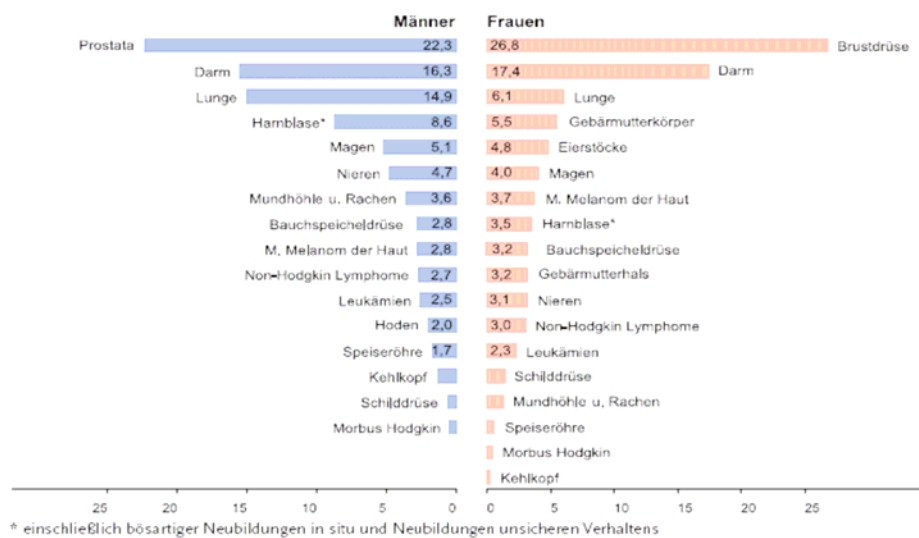


Abb. 1-1: Prozentualer Anteil der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2002 (Männer n = 218.250, Frauen n = 206.000) [GEKID, 2006]

1.2 Grundlagen der Kolonkarzinogenese

Die Krebsentstehung oder Karzinogenese stellt einen langwierigen, mehrstufigen Prozess mit einer Latenzzeit von bis zu mehreren Jahrzehnten dar, der in die Phasen Initiation, Promotion und Progression unterteilt wird [Lodish 2001]. Infolge einer Akkumulation von Mutationen, kommt es bei der Ausbildung einer Krebserkrankung zur Transformation normaler teilungsfähiger Zellen eines Organs oder Gewebes zu malignen bzw. entarteten Tumorzellen. In der Dickdarmschleimhaut sind die undifferenzierten Zellen im unteren Drittel der Kolonkrypten, lokalisiert [Boman et al.,

2004]. Gebildete Tochterepithelzellen werden nach und nach Richtung Darmlumen verdrängt wobei sie differenzieren und ihre Teilungsfähigkeit verlieren (Abb. 1-2). Wenn sie nicht durch Apoptose zerstört werden, lösen sich die Zellen im Laufe der Zeit an der Epithelspitze ab (Exfoliation) und werden mit dem Faeces ausgeschieden.

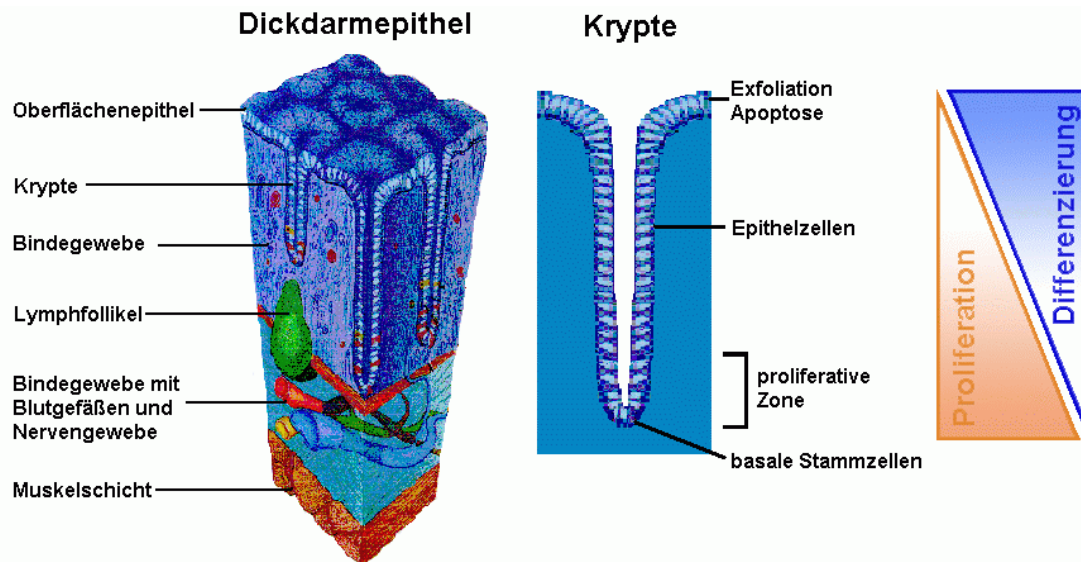


Abb. 1-2: Aufbau des Kolonepithels mit Kolonkrypte [Boman & Benowitz, 2004]

Die für die Krebszellen charakteristischen Veränderungen im Genom beziehen sich auf drei wesentliche Genfamilien, die Protoonko-, Tumorsuppressor- und die DNA-Reparaturgene [Hahn, 2003]. Die Protoonko- und Tumorsuppressorgene kodieren für Faktoren der Zellzahl- bzw. Zellwachstumsregulation, welche während der einzelnen Phasen des Zellzyklus gezielt Signale für Teilung, Differenzierung oder Absterben der Zellen vermitteln. Kommt es zu einer Mutation dieser Gene kann sich das proliferative Verhalten der Zellen im Zellverband verändern und eine Krebserkrankung ausbilden. DNA-Reparaturenzyme ermöglichen durch Beseitigung von DNA-Schäden eine Konstanthaltung des genetischen Codes von einer Zellgeneration zur nächsten. Daher können Mutationen von DNA-Reparaturgenen, einhergehend mit einer verminderten Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden, in einer Erhöhung des allgemeinen Mutationsrisikos einer Zelle resultieren und eine Krebsentstehung stark begünstigen [Alberts, 2002; Branca et al., 2001; Rieger, 2004]. Mutationen der DNA, mit dem Resultat einer Tumorbildung, sind nur in geringem Maße auf eine genetische Prädisposition (etwa 5-10%) oder spontane Fehler bei der DNA-Replikation zurückzuführen. Der Einfluss exogener Faktoren bildet in etwa 90-95% der Fälle die

Ursache für das sogenannte sporadische Auftreten von Mutationen und einer möglichen Karzinogenese [Meyenfeldt, 2005]. Dabei kann es sich um Expositionen aus der Umwelt mit physikalischen (UV-Strahlung), biologischen (Virusinfektionen) oder chemischen Noxen (Nitrosamine) handeln, welche sich in Abhängigkeit von der Expositionsintensität und -häufigkeit sowie der Ernährungsweise und des allgemeinen Lebensstils des Menschen (Alkohol- oder Zigarettenkonsum contra sportliche Betätigung) unterschiedlich schwer auswirken können [Boeing & Kroke, 1999; Gonzalez & Riboli, 2006; Meyenfeldt, 2005].

Der Erwerb der ersten Mutationen auf dem Weg zur malignen Entartung entspricht der Stufe der Initiation. Aus der normalen Zelle wird eine initiierte Zelle, welche sich in zunehmendem Maße von der Ausgangszelle unterscheidet und durch ein stärkeres Reagieren auf Wachstumsreize bzw. schwächeres Reagieren auf Apoptosesignale einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen teilungsfähigen Zellen ihres Verbandes erhält. Die Tumorpromotion, als zweiter Schritt der Karzinogenese, ist durch ein selektiv klonales Wachstum initiierten Zellen mit erhöhter Wachstumsstimulation gekennzeichnet. Es kommt zur Ausbildung präneoplastischer Zellpopulationen (Adenome). Die Zellen reagieren nun stärker auf äußere Wachstumssignale bzw. Wachstumsreize, wie sie durch Hormone oder Wachstumsfaktoren ausgelöst werden, was in Folge zunehmender Proliferation zu DNA-Instabilität und einer Beeinträchtigung epigenetischer Kontrollmechanismen führt. Das Mutationsrisiko steigt dadurch weiter an und aus gutartigem (benignem) Tumorgewebe entwickelt sich ein zunehmend autonom verhaltendes bösartiges (malignes) Gewebe, was als Tumorprogression bezeichnet wird. Im Zuge dieser malignen Transformation beginnen die Zellen sich stetig zu teilen und zu entdifferenzieren ohne dabei auf Apoptosesignale zu reagieren. Es bildet sich eine heterologe Tumormasse aus Zellklonen unterschiedlichen Genotyps, welche umliegendes, gesundes Gewebe verdrängt. Durch Ausbildung neuer Kapillargefäße (Angiogenese) wird das maligne Karzinom mit Nährstoffen sowie Sauerstoff versorgt und Tumorzellen gelangen zunehmend in die Blutbahn, wodurch sie zu anderen Körperregionen gelangen und sogenannte Tochtermetastasen (Metastasierung) bilden [Bodmer, 2006; Marquardt & Schäfer, 2004]. Das klassische Modell (Abbildung 1-3), welches den Weg von der Initiation bis zur Progression eines kolorektalen Karzinoms beschreibt, wurde von Fearon und Vogelstein entwickelt [Fearon & Vogelstein 1990]. Demnach entstehen

kolorektale Karzinome durch eine Aufeinanderfolge von Mutationen bestimmter Protoonko- und Tumorsuppressorgene (multi hit-Modell) über einen zum Teil mehrere Jahrzehnte andauernden Zeitraum, was sich in einer Serie erkennbarer histologischer Veränderungen ausdrückt und den exponentiellen Anstieg kolorektaler Karzinome im Alter erklärt.

Etwa 80% aller adenomatösen Polypen und kolorektalen Karzinome weisen einen Funktionsverlust des APC-Tumorsuppressorgens (adenomatous polyposis coli) auf, wodurch eine Mutation dieses Gens zu den frühesten genetischen Veränderungen im Prozess der Kolonkarzinogenese zählt [Fodde et al. 2001]. Im Zusammenhang mit dem wnt-Signalweg ist das APC-Protein an der Regulation der Menge intrazellulären β -Catenins beteiligt. Die Deletion oder Inaktivierung beider APC-Allele (Loss of Heterocycosity) resultiert in einem Anstieg des β -Catenin-Spiegels, in dessen Folge der proliferationsfördernde Transkriptionsfaktor Tcf-4 aktiviert wird [Bienz & Clevers, 2000; Hao et al., 2001; Iwamoto et al. 2000]. Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) weisen bereits in der Keimbahn ein mutiertes APC-Allel auf, wodurch es ab dem 10. Lebensjahr zur Ausbildung adenomatöser Polypen in der Kolonwand kommt. Bis zum 20. Lebensjahr erhöht sich die Anzahl der Polypen auf bis zu Tausend und der Kolon muss entfernt werden (Proktokolektomie) um die Bildung eines kolorektalen Karzinoms auszuschließen [Lodish, 2001].

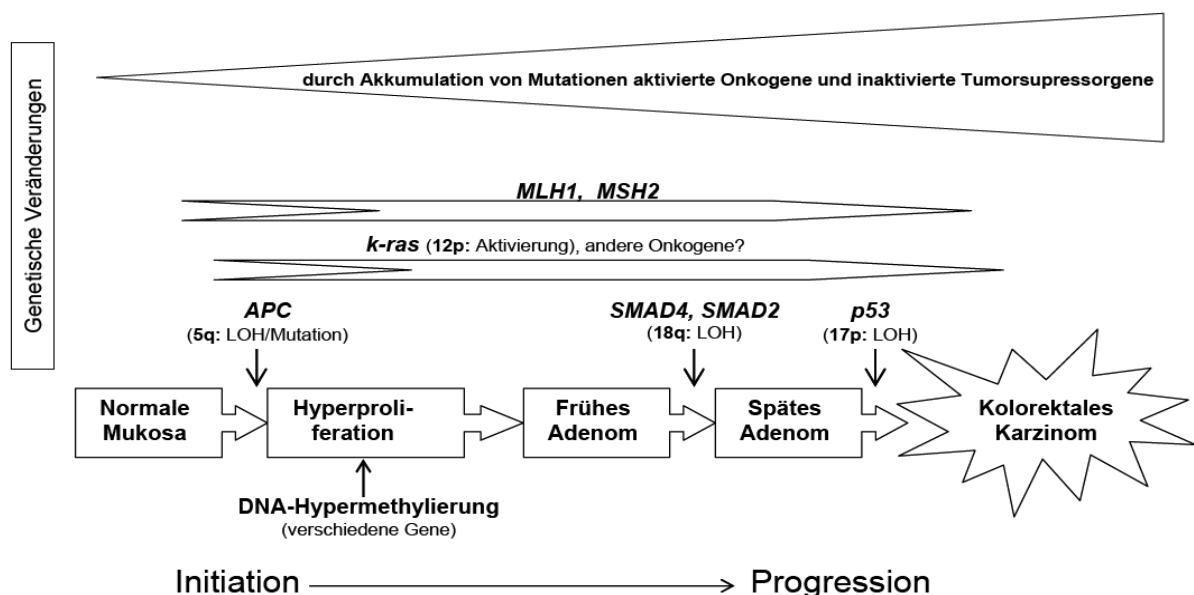


Abb. 1-3: Mehrstufenmodell der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms nach Fearon & Vogelstein [1990]; [Fodde et al., 2001; Frattini et al., 2004; Lodish et al., 1999]

Die Gen-aktivierende Mutation des Ras-Protoonkogens ist in etwa 50% der sporadischen kolorektalen Adenomen und Karzinomen zu finden. Eine Überexpression von Ras, als membranständiges G-Protein, führt zur Induktion proliferationsfördernder Signaltransduktionskaskaden [Adjei, 2001]. Bei MLH1 und MSH2 handelt es sich um DNA-Mismatch-Reparaturgene, dessen Funktionsverlust den Prozess der Tumorbildung zusätzlich beschleunigt. SMAD4/SMAD2 sind Bestandteil der TGF- β (transforming growth factor β) vermittelten wachstumshemmenden, Zelldifferenzierenden und tumorsupprimierenden Signaltransduktion. Eine Deletion oder Inaktivierung dieser Gene (in ca. 75% der Kolontumore nachweisbar) stellt einen weiteren Schritt zur Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms dar [Müller, 2002]. Endgültige Malignität erlangt der Tumor nach dem Verlust des p53-Tumorsuppressorgens, welchen etwa 70% der Kolontumore aufweisen [Fodde et al., 2001]. Das Protein wird bei vorliegendem DNA-Schaden expremiert und vermittelt über die Expression des p21-Cyclin/Cdk-Inhibitorproteins einen Zellzyklusarrest zwischen G1- und S-Phase, was im Normalfall eine Behebung des Schadens ermöglicht. Gleichzeitig ist p53 in der Lage, die Apoptose von Zellen mit schwerem bis irreparablen DNA-Schaden einzuleiten [Bodmer, 2006; Frattini et al., 2004].

Sowohl das Auftreten als auch die Reihenfolge der dargestellten genetischen Veränderungen erfolgen nicht zwingend bei der Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms, sind aber dennoch vorherrschend [Hanahan & Weinberg, 2000; Lodish, 2001].

1.3 Ökosystem Dickdarm

Der Dickdarm ist dasjenige Organ des Verdauungstraktes, das am häufigsten von Krebs befallen wird. Daher wird Dickdarmkrebs meist auch mit dem Begriff Darmkrebs gleichgesetzt. Die Funktion des Dickdarms besteht in der Rückresorption von Wasser und Mineralstoffen aus dem Darmlumen und der Speicherung des Faeces (v.a. Mastdarm) bis zur Exkretion. Die Transitzeit des Darminhalts ist dadurch im Vergleich zum Dünndarm erhöht, weshalb das Darmepithel auch länger einer möglichen Exposition mit Schadstoffen ausgesetzt ist. Die hohe Inzidenz des

kolorektalen Karzinoms im Vergleich zu Karzinomen des oberen Verdauungstraktes wird dadurch z.T. begründet.

Die im Dickdarm vorherrschenden Wechselwirkungen zwischen Darmflora und Darminhalt, im Zusammenhang mit der langen Transitzeit des Faeces, stellen einen weiteren entscheidenden Einflussfaktor in Bezug auf Ausbildung und Prävention eines Karzinoms des Darmepithels dar. Die Mikrobiota des Darms bildet ein komplexes und dynamisches Ökosystem, welches sich vom Zeitpunkt der Geburt an stetig weiter entwickelt und in seiner mikrobiellen Zusammensetzung maßgeblich durch die Nahrungszufuhr beeinflusst wird [Biesalski & Grimm, 2002]. Bei einem gesunden Erwachsenen mittleren Alters besteht dieses Ökosystem zu mehr als 99% aus anaeroben Bakterien, wobei die Bakterienanzahl des Dickdarms, mit $10^{11} - 10^{12}$ Zellen/g Faeces, die des Dünndarms (ca. $10^3 - 10^7$ Zellen/g Faeces) weitaus überschreitet. Schätzungen gehen von einer Vielfalt von bis zu 1000 Bakterienarten aus, die sich auf die unterschiedlichen Darmabschnitte verteilen und über den Prozess der Fermentation ihr Überleben sichern [Elmadfa & Leitzmann, 1998; O'Hara & Shanahan, 2006; Sanders, 1999].

Der Mensch profitiert auf verschiedene Weise vom „Ökosystem Darm“. So ist die intestinale Mikroflora direkt und indirekt, durch die Stimulierung des schleimhautassoziierten Immunsystems, an der Abwehr von Krankheitserregern beteiligt [Kelly et al., 2005; Mazmanian et al., 2005]. Schadstoffe können durch den bakteriellen Metabolismus z.T. inaktiviert werden [Wollowski et al., 2001]. Zusätzlich regt die Mikroflora die Darmmotilität an, kann unterstützend auf Verdauung und Nährstoffabsorption wirken, versorgt das Darmepithel mit Nährstoffen und Energie (siehe Kap. 1.3.2) und synthetisiert Vitamine (v.a. Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Cobalamin, Vitamin K) [O'Hara & Shanahan, 2006]. Positive Effekte dieser Art werden vor allem durch Bakterienspezies der Gattungen *Lactobazilli*, *Bifidobacteria*, *Eubacteria*, *Bacteroides* oder *Escherichia Coli* hervorgerufen [Gibson & Roberfroid, 1995; Sanders, 1999]. Allerdings können durch die Darmflora auch negative Effekte wie Krämpfe oder Diarrhoe hervorgerufen werden. Neben einer Fehlernährung (z.B. beim Verzehr kontaminierter Lebensmittel oder bei Maldigestions- bzw. Malabsorptionsbeschwerden) gehören toxinbildende Bakterien (hauptsächlich der Gattungen *Staphylococci*, *Clostridia*, *Vibrionaceae*, *Enterobacteria* und *Escherichia Coli*) zu den Auslösern solcher Erscheinungen. Ebenfalls negativ für den Menschen

kann sich die Bildung und Aktivierung von Kanzerogenen durch die Darmflora (z.B. durch *Escherichia Coli*, *Streptococci*, *Bacteroides*), im Zusammenhang mit einer Steigerung des Krebsrisikos, sowie die Entstehung intestinaler Fäulnisprozesse (v.a. durch *Escherichia Coli* und *Bacteroides*) auswirken [Gibson & Roberfroid, 1995]. Letzteres kann als Folge einer gesteigerten Fermentation von Proteinen und einer daraus resultierenden Bildung von Ammoniak und biogenen Aminen zu Entzündungen der Darmwand führen [Darcy-Vrillon et al., 1996; Macfarlane et al., 1986].

1.3.1 Präbiotika und Probiotika

Eine Zunahme des Wachstums von Bakteriengattungen, welche mit einer gesundheitsfördernden Wirkung für den Menschen in Verbindung gebracht werden (v.a. *Lactobazilli*, *Bifidobacteria*), führt in Folge eines zunehmenden Populationsdrucks im Zusammenhang mit einer möglichen Milieuänderung (z.B. Senkung des pH-Wert) zur Wachstumshemmung gesundheitsschädigender Keime. Exogen, über die Nahrungszufuhr, kann die Zusammensetzung der Darmflora potentiell beeinflusst werden. Der Einsatz von Prä- und Probiotika verfolgt dieses Ziel der selektiven Veränderung der Intestinalflora in Richtung von Keimen mit positiven Wirkungen [Sanders, 1999]. Als Probiotika wird ein Produkt bezeichnet, welches lebende Mikroorganismen enthält, die die Darmflora des Konsumenten bzw. Wirtes verändern können und dadurch deren Gesundheitszustand positiv beeinflussen [Oberreuther-Moschner et al., 2004; Sanders, 1999]. So zeigten Probiotika in Tierversuchen eine Schutzwirkung vor induzierten DNA-Schäden [Pool Zobel et al., 1996; Wollowski et al., 1999]. Einige Arten der Milchsäure-produzierenden Gattungen *Lactobazilli* und *Bifidobacteria* sowie *Streptococcus* werden traditionell zur Herstellung fermentierter Milchprodukte, wie Sauermilch oder Joghurt, verwendet. Heute werden sie als Probiotika in verschiedenen Produkten eingesetzt. Probiotische Nahrungsmittel müssen durch bestimmte lebensmitteltechnologische Verfahren (z.B. Verkapselung) ein Überleben der Bakterienkulturen im Gastrointestinaltrakt (GIT) bis zum Dickdarm gewährleisten.

Der Begriff Präbiotika wurde von Gibson und Roberfroid [1995] eingeführt und wird für unverdauliche Nahrungsinhaltsstoffe verwendet, die als Nährsubstrat selektiv das

Wachstum und/oder die Aktivität bestimmter Bakterien im Kolon stimulieren und dadurch positive Wirkungen auf die Gesundheit des Wirtes erzielen können [Campbell et al., 1997; Gibson & Roberfroid, 1995; Pool-Zobel, 2005].

Als besonders wirksam in dieser Hinsicht erweisen sich die als Reservestoffe in verschiedenen Pflanzen (z.B. Zwiebel, Knoblauch, Chicorée) vorkommenden Fructane vom Inulin-Typ. Im Tierversuch konnten Inulingaben induzierte Tumore verhindern [Verghese et al., 2002; Taper et al., 1998] und die Apoptoserate erhöhen [Hughes & Rowland, 2001]. Aufgrund der $\beta(1-2)$ -glykosidisch verknüpften Fructose-Moleküle dienen Fructane nur jener Mikroflora als Substrat, welche über eine β -Fructosidase-Aktivität verfügt. Dies trifft vor allem auf die Bifidobakterien [Muramatsu et al., 1994, Gibson, 1999], aber auch auf einige Vertreter der Lactobazillen und Eubakterien zu [Biesalski & Grimm, 2002].

Der Begriff Synbiotika wird für die Kombination von Pro- und Präbiotika verwendet und deutet dem Wort nach auf synergistische Effekte dieser beiden Gruppen hin. So konnten in verschiedenen Studien additive Effekte durch die kombinierte Gabe von Prä- und Probiotika, hinsichtlich einer Reduktion genotoxischer Potentiale im Darm, festgestellt werden [Rowland et al., 1998; Femia et al., 2002; Klinder et al., 2004].

1.3.2 Intestinale Fermentation

Unter dem Begriff Fermentation versteht man die biotechnologische Umsetzung organischen Materials durch Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) oder durch Zusatz von Enzymen (Fermenten) [Fox & Whitesell, (1995)].

Als fermentierbares Substrat für die menschliche Darmflora dienen zum größten Teil lösliche (z.B. Pektin, Fructane, Glukane, Alginate) und unlösliche Ballaststoffe (z.B. Cellulose, Lignane, resistente Stärke). Sie können durch die Enzyme des oberen Gastrointestinaltraktes (GIT) nicht hydrolysiert werden und gelangen dadurch unverdaut in den Dickdarm. Man geht davon aus, dass bei einer normalen ausgewogenen Ernährung mehr als 75% der Ballaststoffe im Dickdarm abgebaut werden [Slavin, 2000].

Unverdautes Nahrungsprotein, endogenes Protein aus intestinalen (z.B. Pankreasenzyme) und bakteriellen Sekreten (z.B. Lyseprodukte), Mucine (Glykoproteine) und abgeschilferte Epithelzellen der Darmmucosa sind weitere Beispiele für Substrate,

welche zur Energiegewinnung bzw. Fermentation durch die Darmflora genutzt werden und zugleich als Stickstoffquelle dienen [Gibson, 1999; Nordgaard, 1995]. Neben der Sicherung des mikrobiellen Ökosystems im Darm führt eine ballaststoffreiche Ernährung (DGE-Empfehlung: 30g/d), in Folge zunehmenden Quellvermögens, zu einer Erhöhung des Stuhlvolumens im Zusammenhang mit einer Verkürzung der Transitzeit, wodurch potentielle Kanzerogene und andere Schadstoffe, aber auch Gallensäuren, besser gebunden werden und deren Kontaktzeit mit dem Darmepithel verkürzt wird [Harris & Ferguson, 1999; Zoran et al., 1997]. Bei der bakteriellen Fermentation entstehen als Endprodukte kurzkettige Fettsäuren (SCFA – „short chain fatty acids“), Wasser sowie Methan, Wasserstoff und Kohlendioxid [Topping & Clifton, 2001]. Die gebildeten SCFA, welche in ihrer Zusammensetzung zum größten Teil aus Acetat, Propionat und Butyrat bestehen, senken den intestinalen pH-Wert und beeinflussen in dessen Folge die Zusammensetzung der Darmflora durch ein vermehrtes Wachstum acidophiler Keime, wie den Lactobazillen oder den Bifidobakterien. Gibson & Roberfroid [1995] zeigten, dass Oligofructose- und Inulingaben selektiv das Wachstum von Bifidobakterien förderten und Bakterioides, Clostridien, Fusobakterien und verschiedene Kokken in ihrem Wachstum gehemmt waren. Weiterhin werden die Löslichkeitsverhältnisse von Metaboliten im Darm und pH-abhängige Reaktionen, wie die Bildung sekundärer Gallensäuren sowie Enzymaktivitäten, beeinflusst. Auch eine Minimierung der Bildung oder Aktivierung von Kanzerogenen und Co-Kanzerogenen lässt sich bei zunehmend saurem intestinalem Milieu feststellen [De Kok & van Maanen, 2000]. In diesem Zusammenhang spielt ebenfalls die gesteigerte metabolische Aktivität bestimmter acidophiler Kulturen wie den Lactobazillen eine entscheidende Rolle [Wollowski et al., 2001].

Gekoppelt an die Natriumchlorid- und Wasserresorption werden die SCFA zu über 95% von den Kolonozyten aufgenommen, wobei im proximalen Kolon SCFA-Konzentrationen von 70-140 mM und im distalen Kolon SCFA-Konzentrationen von 20-70 mM vorherrschen [Topping & Clifton, 2001]. Acetat und Propionat werden nur in geringem Maße durch das Darmepithel verstoffwechselt und gelangen über die Blutbahn zur Leber und Peripherie. Butyrat wiederum wird mit einem Anteil von ca. 70% als Hauptenergiequelle für Kolonozyten verwendet [Mortensen & Clausen, 1996, Topping & Clifton, 2001]. Neben ihrer Funktion als Energielieferant werden die SCFA,

insbesondere Butyrat aber auch Propionat, mit krebsspräventiven Eigenschaften in Verbindung gebracht. *In vitro* Studien mit Butyrat konnten einen proliferationshemmenden Effekt in transformierten Kolonozyten und einen trophischen, wachstumsfördernden Effekt in normalen Kolonozyten des Menschen feststellen. Butyrat ist in der Lage, in Tumorzellen Apoptose zu induzieren und die Zelldifferenzierung zu fördern [Chapkin et al., 2000; Hague et al., 1996]. Darüber hinaus konnte ein signifikanter Schutz vor H₂O₂-induzierten DNA-Schäden in normalen und transformierten Kolonozyten des Menschen durch Butyrat, in physiologischen Konzentrationen, festgestellt werden [Rosignoli et al., 2001]. Die Aktivierung und Deaktivierung bestimmter Gene durch SCFA, wiederum v.a. durch Butyrat, stellt einen weiteren präventiven Effekt zur Vermeidung eines kolorektalen Karzinoms dar [Mariadason et al., 2000]. Eine Induktion von verschiedenen GST-Isoenzymen, im Zusammenhang mit einer gesteigerten Schutzwirkung gegenüber bestimmter Schadstoffe, konnte von Ebert et al. [2001 und 2003] gezeigt werden. Die Fähigkeit des Butyrats epigenetische Kontrollmechanismen zu beeinflussen liefert hierbei einen wesentlichen Grund für die Regulation der Genexpression. So beeinflusst Butyrat unter anderem die DNA-Methylierung und hemmt die Aktivität von Histon-Deacetylasen, was zu Histonacetylierung und zu einer transkripterfähigen Chromatinstruktur führt. [Davie, 2003; Kiefer et al., 2006; Kobayashi et al., 2003].

Die Ergebnisse großer prospektiver epidemiologischer Studien (z.B. PLCO & EPIC) zeigten meist gegenläufige Ergebnisse in der Bewertung des Ballaststoffverzehrs im Zusammenhang mit einer Einschränkung des Darmkrebsrisikos, was neben unterschiedlichen Studienansätzen und Verzehrsmengen auch an der Vielfältigkeit der Ballaststoffe als Substanzklasse liegt. So konnte ein krebsspräventives Potential der Ballaststoffe durch verschiedene Studien nicht bestätigt werden [Fuchs et al., 1999; Schatzkin et al., 2000; Terry et al., 2001], wohingegen andere Studien eine Verringerung des kolorektalen Krebsrisikos um bis zu 40%, bei Verdopplung der Ballaststoffzufuhr, feststellen konnten [Bingham et al., 2003; Peters et al., 2003]. In einer Zusammenfassung der verschiedenen Studienergebnisse wurden die Ballaststoffe erst ab einem täglichen Verzehr von 30 g mit einer krebsspräventiven Wirkung in Verbindung gebracht [Ferguson & Harris, 2003].

1.4 In vitro Fermentation:

Schätzungen zufolge könnte die Zahl der Darmkrebsfälle durch eine ausgewogene, gesunde Ernährungsweise bei gleichzeitiger Vermeidung von Übergewicht, verbunden mit einer moderaten körperlichen Aktivität und der Reduzierung des Alkohol- und Zigarettenkonsums, um ca. 70% gesenkt werden [Willet, 2003]. Damit stellt das kolorektale Karzinom die viscerale Krebsform dar, welche am besten verhindert werden könnte. Da das kolorektale Karzinom, trotz dieser Tatsache, nachwievor zu den Krebsformen mit der höchsten Inzidenz zählt [Meyenfeldt, 2005], ist eine verbesserte Aufklärung der Bevölkerung hinsichtlich einer gesunden Ernährungsweise, im Zusammenhang mit einer stetigen Verbesserung ernährungstoxikologischer Analyseverfahren, notwendig. Mit der *in vitro* Fermentationssimulation lassen sich krebspräventive bzw. kanzerogene Effekte bestimmter Nahrungsmittelinhaltsstoffe, im Zusammenhang mit den komplexen Einflüssen die vom Wachstum und/oder Metabolismus der Darmflora ausgehen, gezielt untersuchen und bestimmte Prozesse der Verdauung im Dickdarm erklären. Biologische Aktivitäten von Fermentationsprodukten (SCFA etc.), deren Bildung in Abhängigkeit vom fermentierten Substrat stark variiert, können im Anschluss analysiert werden. Einfache *in vitro* Fermentationssysteme basieren auf einer meist 24-stündigen Fermentation der Testsubstanzen mit einer aus humanen Faecesproben und einem Salzpuffer hergestellten Faecessuspension. In einem einzelnen Reaktionsgefäß (Batch) wird die Fermentation unter anaeroben Bedingungen und entsprechend der Körpertemperatur bei 37°C durchgeführt. Diese von Barry et al. [1995] erstmalig publizierte Methode stellt die schnellste durchführbare Form der *in vitro* Fermentation dar und wird auch als „one-Batch-Kultur“ oder „one-Batch-*in vitro*-Fermentation“ bezeichnet (siehe Abb. 1-4). Nach Ablauf der Fermentation können die durch verschiedene Zentrifugationsschritte gewonnenen Fermentationsüberstände unter anderem auf ihre Zusammensetzung oder ihr toxisches bzw. ihr präventives Potential untersucht werden (siehe Tabelle 1-1 Seite 17) [Beyer-Sehlmeier et al., 2003].

Gibson & Macfarlane [1988] führten die *in vitro* Simulation des Kolons in einem sogenannten „kontinuierlichen“ Fermentationssystem mit zwei oder drei aufeinanderfolgenden Reaktionsgefäßen durch (siehe Abb. 1-5) [Macfarlane et al., 1998a, 1998b,

2005]. Die zusätzlichen Gefäße dienen der Simulation proximaler und distaler Regionen des Kolons und ermöglichen dadurch eine getrennte Analyse von Prozessen bzw. Reaktionen dieser Bereiche. Dieses teilweise über mehrere Wochen betriebene Fermentationssystem wird kontinuierlich, in bestimmten zeitlichen Abständen, mit einem speziellen Nährmedium gespeist und mittels Pumpen über die mit einer Faecessuspension beimpften Gefäße weitergeleitet. Durch die Abnahme der Menge an fermentierbarem Substrat von Gefäß zu Gefäß und durch die Einstellung entsprechender physiologischer pH-Werte (prox. \rightarrow dist. : ca. 5,5 \rightarrow 7) wird das Milieu der einzelnen Reaktionsgefäße an die Gegebenheiten im Darm angepasst. Ziel der mit dieser mehrstufigen *in vitro* Fermentation durchgeführten Studien war die Untersuchung des Wachstums und der Aktivität (Bildung von Enzymen und Metaboliten) bestimmter Mikroorganismen in simulierten Bereichen des Dickdarms, in Abhängigkeit von den zu fermentierenden Testsubstanzen (siehe Tabelle 1-1 Seite 17).



Abb. 1-4: one-Batch *in vitro*-Fermentation (einzelne Reaktionsgefäße)

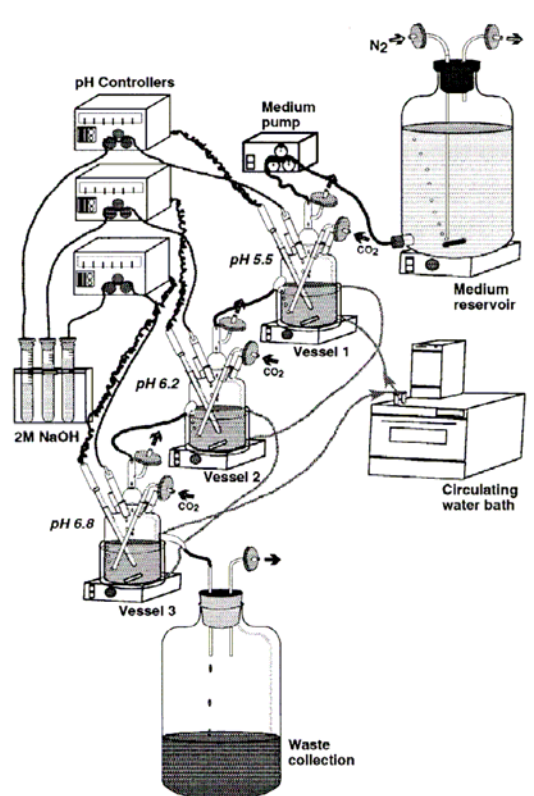


Abb. 1-5: Schematische Darstellung eines kontinuierlichen Fermentationssystems mit 3 aufeinanderfolgenden Reaktionsgefäßen, zur Simulation proximaler und distaler Bereiche des Kolons [Macfarlane et al., 1998a]

Handelt es sich bei den zu fermentierenden Substraten um einen Komplex aus ausschließlich durch die Darmflora verwertbaren Inhaltsstoffen und solchen, welche bereits im oberen Verdauungstrakt von Mensch und Säugetier einer Veränderung durch Verdauungsprozesse unterliegen, bietet sich ein *in vitro* Fermentationssystem verbunden mit einer Simulation des gesamten GIT an. Solch ein System wurde erstmals von Molly et al. [1993] mit der Entwicklung des SHIME-Modells (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) realisiert (siehe Abb. 1-6). Fünf bis sechs aufeinanderfolgende Reaktionsgefäße repräsentieren die einzelnen Orte der Verdauung. Im ersten Gefäß wird der Magen simuliert, die anschließende Verdauung im Dünndarm erfolgt in einem oder zwei Gefäßen (Teilung in Duodenum/Jejunum und Ileum möglich), ehe sich die eigentliche Fermentation mit der Simulation des Dickdarms, basierend auf der nach Macfarlane et al. [1989] entwickelten Methode, in drei weiteren Gefäßen anschließt. Um das System an die Bedingungen des GIT anzupassen, wurde ein spezielles Nährmedium entwickelt, welches Komponenten des Darmlumens (z.B. Mineralien, Polysaccharide, Mucin) sowie mikrobiologisch stabilisierende Substanzen auf Proteinbasis (z.B. Trypton, in der Mikrobiologie für die Herstellung von Nährböden und -lösungen eingesetzt) beinhaltet (siehe Anhang Seite 88). Die genaue Zusammensetzung des Mediums variierte in verschiedenen Studien [z.B. De Boever et al., 2000a; Macfarlane et al., 1998a; Kontula et al., 1998]. Das SHIME-Modell wird als „kontinuierliches“ Fermentationssystem zum Teil über mehrere Wochen betrieben, wobei Medium und Testsubstanz (zu Beginn nur Medium um faecale Flora zu stabilisieren) in bestimmten zeitlichen Abständen appliziert (sogenannter „feeding turn“; 3mal täglich alle 8h) und vom ersten Reaktionsgefäß ausgehend nach und nach über Pumpen weitergeleitet werden. Die Verweildauer des Reaktionsgemischs in den Gefäßen entspricht dabei der Verweildauer der Nahrung in den einzelnen Verdauungsorganen. Um den Verdauungsprozess des Dünndarms zu simulieren wird ein basisches Verdauungsssekret oder „intestinales Extrakt“, welches Pankreasenzyme und Gallensäuren beinhaltet, zeitgleich mit der Füllung des Duodenum-repräsentierenden Gefäßes appliziert. Zur weiteren Anpassung an die Bedingungen im GIT wird der pH-Wert, die Temperatur und die entsprechende Sauerstoffatmosphäre in den jeweiligen Reaktionsgefäßen eingestellt sowie eine konstante Durchmischung gewährleistet [Decroos et al., 2006; Meddah et al., 2001; Van de Wiele et al., 2004 & 2007]. Mit dem SHIME-Modell lassen sich spezifische

Veränderungen der faecalen Mikroflora hinsichtlich ihrer Zusammensetzung (Wachstum bestimmter Mikroorganismen) und Aktivität (Enzymaktivität, Produktion von Metaboliten) in Abhängigkeit von Testsubstanzen wie zum Beispiel Soja, bestimmten Getreidekleie-Arten oder Molke feststellen (siehe Tabelle 1-1 Seite 17).

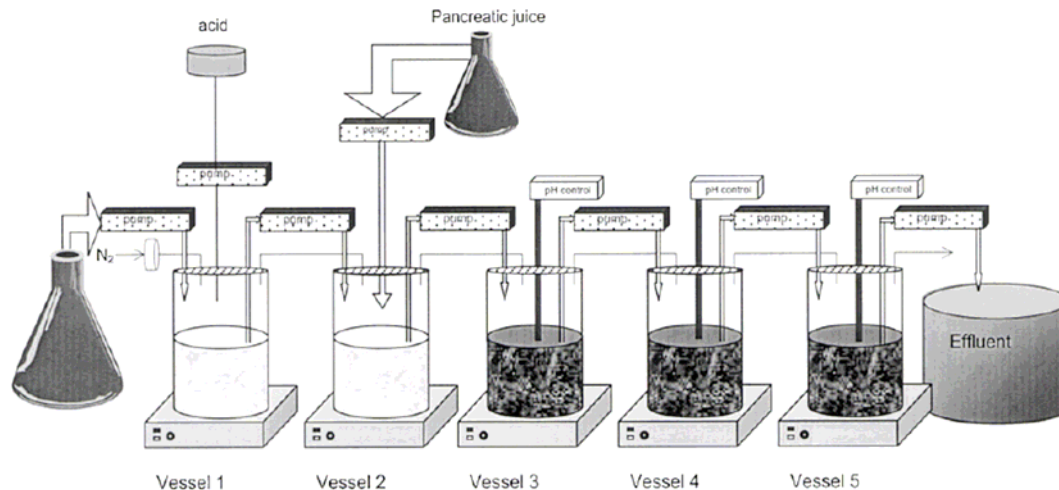


Abb. 1-6: Schematische Darstellung des von Molly et al. [1993] entwickelten, kontinuierlichen SHIME-Fermentationsmodells zur Simulation des gesamten GIT *in vitro* [De Boever et al., 2000a]

Das holländische Institut für Angewandte Naturwissenschaftliche Forschung (TNO) hat mit der Entwicklung des TIM-Modells (TNO Intestinal Models) ein weltweit einzigartiges und technisch ausgereiftes, repräsentatives *in vitro* System zur Simulation der gastrointestinalen Verdauung geschaffen [Minekus et al., 1995 & 1999]. Diese komplett computergesteuerte Simulation erfolgt in einem röhrenförmigen System, welches die Testsubstanzen in einem Nährmedium durchlaufen. Über die Einstellung des pH-Wertes, die Zufuhr von Enzymen bzw. Verdauungssekreten und die Beimpfung mit Mikroorganismen (in kultivierter Form oder aus Faecesproben) werden phasenweise die in Magen und Darm vorherrschenden Bedingungen geschaffen. Testsubstanzen und Medium durchlaufen das System in einem flexiblen Silikonschlauch, welcher von einem starren Glasmantel umgeben ist. Zwischen Silikonschlauch und Glasmantel fließt 37°C temperiertes Wasser. Über Pumpen erzeugte hydraulische Druckveränderungen ermöglichen ein Zusammendrücken und Weiten des Silikonschlauchs, entsprechend der Darmperistaltik, wodurch sich die Komponenten durchmischen. Mittels Dialyse durch eine porige Membran wird eine Resorption von niedermolekularen Stoffen und Wasser simuliert. Mögliche Anwendungsbereiche sind in Tabelle 1-1 dargestellt.

Tabelle 1-1:
wichtige *in vitro* Fermentationstechniken und ihre Anwendungsbereiche

<i>in vitro</i> Fermentationsmethoden	Methodenanwendung mit Beispielen aus der Literatur
one-batch- <i>in vitro</i> -Fermentation nach Barry et al. [1995] (Kolonsimulation in einzelnen Reaktionsgefäßen)	chemisch, biologische Charakterisierung gewonnener Fermentationsüberstände <ul style="list-style-type: none"> • Messung von Fermentationsprodukten & Metaboliten als Maß der Fermentierbarkeit unverdaulicher Nahrungsbestandteile [Barry et al., 1995; Beyer-Sehlmeier et al., 2003; Sayar et al., 2007] • Zellwachstumsuntersuchungen [Beyer-Sehlmeier et al., 2003] • Expressionsanalytik [Beyer-Sehlmeier et al., 2003] • Modifikation genotoxischer Schadwirkungen [Beyer-Sehlmeier et al., 2003] • Veränderungen der Mikroorganismenzusammensetzung [Manderson et al., 2005]
kontinuierliche Fermentations- systeme nach Gibson & Macfarlane [1988] (Kolonsimulation in 2-3 aufeinanderfolgenden Reaktionsgefäßen)	testsubstanzabhängige Veränderungen des Wachstums und der Aktivität faecaler Flora nach mehrtägigen Applikationsphasen <ul style="list-style-type: none"> • Messung von Fermentationsprodukten & Metaboliten (z.B. SCFA, Degradationsprodukte, bestimmte Gase) [Macfarlane et al., 1998a, 1998b & 2005] • Veränderungen der Mikroorganismenzusammensetzung [Macfarlane et al., 1998a, 1998b & 2005] • bakterielle Enzymaktivitätsassays [Macfarlane et al., 1998b & 2005]
kontinuierliche Fermentations- systeme nach Molly et al. [1993] - SHIME-Modell (Simulation des gesamten GIT in 5-6 aufeinanderfolgenden Reaktionsgefäßen)	testsubstanzabhängige Veränderungen des Wachstums und der Aktivität faecaler Flora nach mehrtägigen Applikationsphasen <ul style="list-style-type: none"> • Messung von Fermentationsprodukten & Metaboliten (z.B. SCFA, Degradationsprodukte, bestimmte Gase) [De Boever et al., 2000a & 2000b; Decroos et al., 2006; Meddah et al., 2001; Van de Wiele et al., 2004 & 2007] • Veränderungen der Mikroorganismenzusammensetzung [De Boever et al., 2000a; Kontula et al., 1998; Meddah et al., 2001; Van de Wiele et al., 2004 & 2007] • bakterielle Enzymaktivitätsassays [Van de Wiele et al., 2004]
TIM – Modell von TNO-Holland (Simulation des gesamten GIT in einem Röhrensystem möglich)	für die Analyse von Reaktionen & Effekten komplexer Lebensmittel, einzelner Inhaltsstoffe (Schadstoffe oder protektive Stoffe) sowie bestimmter Pharmaka im GIT <ul style="list-style-type: none"> • Messung von Fermentationsprodukten & Metaboliten (z.B. SCFA, Degradationsprodukte, bestimmte Gase) [Krul et al., 2002] • Veränderungen der Mikroorganismenzusammensetzung [Krul et al., 2002, Marteau et al., 1997] • Resorption von Spaltprodukten und Metaboliten – Bioverfügbarkeit [Minekus et al., 1999; Salovaara et al., 2003; Verwei et al., 2003] • Bildung (anti-)genotoxischer oder (anti-)oxidativer Potentiale [Krul et al., 2001]

1.5 Ziele der Arbeit

Die *in vitro* Fermentation ist ein geeignetes Hilfsmittel bei der Beurteilung fermentierbarer Nahrungsmittelinhaltsstoffe, welche nicht einer Verdauung im oberen GIT unterliegen. Hinsichtlich der Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms lassen sich mit der *in vitro* Fermentation Effekte solcher Nahrungsmittelinhaltsstoffe im Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Wachstums und/oder Metabolismus der Darmflora untersuchen und erklären. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können zur Aufklärung der Bevölkerung hinsichtlich einer Verbesserung der gesunden Lebensweise über die Ernährung beitragen.

Ziel dieser Arbeit war die Modifikation des one-batch-*in vitro*-Fermentationsverfahrens nach Barry et al. [1995], durch eine vorherige Simulation der Prozesse des oberen GIT, zur Anpassung des Systems an *in vivo* Bedingungen. Die zusätzliche Simulation der Verdauungsprozesse des Magens und Dünndarms, mit der Einhaltung organspezifischer Simulationszeiträume, der Zugabe eines Verdauungssekretes (Extrakt aus Pankreasenzymen und Gallensäuren) und der Einstellung eines entsprechenden Milieus (pH-Wert, O₂-Atmosphäre) erfolgte in Anlehnung an das von Molly et al. [1993] entwickelte, kontinuierliche *in vitro* Fermentationssystem (SHIME-Modell) unter Verwendung eines Nährmediums. Die anschließende Simulation des Dickdarms bzw. die Fermentationssimulation wurde gemäß der Vorgaben von Barry et al. [1995] in einzelnen Reaktionsgefäßen bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad über 24 h durchgeführt. Hierdurch sollte im Vergleich zum SHIME-Modell ein einfaches, schnell durchführbares one-batch-*in vitro*-Fermentationsverfahren etabliert werden, welches zugleich eine vorherige Simulation der Prozesse des oberen GIT beinhaltet.

Die aus der Fermentation verschiedener Testsubstanzen (Komponenten pflanzlicher Nahrungsmittel) gewonnenen Fermentationsüberstände sollten hinsichtlich folgender Kriterien charakterisiert werden:

- Menge an gebildeten Fermentationsprodukten durch Messung des Gehaltes an SCFA, primären und sekundären Gallensäuren sowie Ammoniak
- Beeinflussung des Wachstums und Metabolismus von Kolonkarzinomzellen (HT29)
- Induktion genotoxischer Schäden in Kolonkarzinomzellen (HT29)

Parallel zu der Fermentation mit gastrointestinaler Simulation, wurde die nach Barry et al. [1995] entwickelte und ausschließlich den Fermentationsprozess im Dickdarm simulierende Methode mit selbigen Testsubstanzen durchgeführt. Die nach Anwendung beider Fermentationsverfahren gewonnenen Fermentationsüberstände wurden hinsichtlich der genannten Kriterien miteinander verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle verwendeten Materialien und Chemikalien sind im Anhang aufgelistet.

2.1.1 Zelllinien

J. Fogh und G. Trempe etablierten 1964 die permanente humane Zelllinie HT29 unter Verwendung von Zellen, die einem moderat differenzierten Adenokarzinom des Kolons einer 44-jährigen Patientin entnommen wurden. HT29-Zellen (oder auch HT29-Stammzellen) sind hypertriploid, undifferenziert und entsprechen aufgrund ihrer Vielzahl chromosomaler Aberrationen einem sehr späten Stadium der kolorektalen Karzinogenese [Fogh & Trempe, 1975]. Dennoch scheinen die Zellen eine gewisse genomische Stabilität während ihrer Kultivierung wiedererlangt zu haben [Kawai et al., 2002] und können deshalb als ein gutes Modell für Untersuchungen zum Kolonkrebs im Sinne der Chemoprävention genutzt werden.

Für die vorliegende Arbeit wurden HT29-Zellen in den Passagen 15 bis 52 verwendet.

2.1.2 Testsubstanzen

Für den Vergleich der nach zwei Versuchsanordnungen durchgeführten *in vitro* Fermentation wurden die ballaststoffreichen Produkte Inulin und Weizenkleie (WK), sowie ein Apfelpolyphenol-Extrakt (AS05) als Testsubstanzen eingesetzt. Details zur genaueren Zusammensetzung sind im Anhang (ab Seite 89) zu finden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der HT29 Zellen

Die HT29-Zellen wurden in 75 cm² großen Zellkulturflaschen in 15 ml DMEM, mit einem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Das Wachstum der Zellen erfolgte in einem Brutschrank unter kontrollierten Bedingungen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5%.

2.2.1.1 Zellernte

Vor jeder Verwendung erfolgte eine mikroskopische Betrachtung der Zellen, um den Konfluenzgrad, die Morphologie und eine mögliche Kontamination der Zellen beurteilen zu können. Die Behandlung der Zellen fand unter sterilen Bedingungen statt und alle für die Zellkultur verwendeten Substanzen wurden auf 37°C erwärmt. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurden zunächst 5 ml eines Trypsin/Versene-Gemisches in der Zellkulturflasche verteilt und nach 2-4 min Einwirkzeit auf einer 37°C temperierten Heizplatte wieder abgesaugt. Weitere 4 min später hatten sich die Zellen aufgrund der proteolytischen Eigenschaft des Trypsin-Gemisches vollständig vom Flaschenboden gelöst (Spaltung von Adhäsionsproteinen) und konnten in DMEM aufgenommen werden. Das Passagieren der Zellen erfolgte im Verhältnis 1:2,5 bis 1:10 im Abstand von 2 bis 5 Tagen.

Für die Bestimmung der relativen Zellzahl (Zellen pro ml) und der Vitalität [%] wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Berechnung erfolgt aufgrund des bekannten Volumens der Neubauer-Zählkammer (0,1 µl pro Großquadrat) nach Gleichung 2-1.

Gleichung 2-1: Berechnung der Zellzahl

$\text{rel. Zellzahl [Zellen pro ml]} = \text{Zellzahl pro Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
--

Das Prinzip des Trypanblau-Ausschlusstest zur Bestimmung der Vitalität beruht auf der Tatsache, dass nur Membranen toter Zellen für den Farbstoff durchlässig sind und die toten Zellen, aufgrund der anschließenden Bindung an zytosolische Proteine, mikroskopisch blau erscheinen lässt [SANDSTRÖM 1965]. Somit kann der Anteil vitaler Zellen nach Gleichung 2-2 bestimmt werden.

Gleichung 2-2: Berechnung der Vitalität

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{lebende (ungefärbte) Zellen pro Großquadrat} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl pro Großquadrat}}$$

Zusätzlich zur Trypanblau-Messung erfolgte die Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels CASY®-Zellzähler (Innovatis AG) (siehe Pkt. 2.2.5 akute Zytotoxizität & 2.2.8 Comet Assay).

2.2.2 Fermentation

2.2.2.1 Bestimmung des pH-Wertes

Alle Messungen des pH-Wertes erfolgten mittels pH-Meter EcoScan Ion 6 von Eutech Instruments.

2.2.2.2 one-Batch in vitro-Fermentation nach Barry et al. [1995]

[„alte“ Fermentationsmethode – AFM]

2.2.2.2.1 Prinzip

Mit der *in vitro* Fermentation soll die Auswirkung der Testsubstanzen im Dickdarm, speziell deren Einfluss auf das mikrobielle Ökosystem simuliert werden. Die Fermentation der Testsubstanzen mit Faeces, als Quelle für Mikroorganismen des Kolons, wurde bei 37°C und unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Dauer der Fermentation betrug 24 Stunden. Nach Beendigung der Fermentation wurden durch Zentrifugation und Filtration Überstände für die anschließende Analyse gewonnen.

2.2.2.2.2 Durchführung

Die Fermentation wurde mit einem Gesamtvolumen von 100 ml und einer Testsubstanzkonzentration von 10 g pro Liter Fermentationssuspension (FS) durchgeführt [Barry et al., 1995; Beyer-Sehlmeyer et al., 2003]. In Abhängigkeit vom Anteil fermentierbarer Inhaltsstoffe (lösliche & unlösliche Ballaststoffe; Proteine), wurden dementsprechend Testsubstanz-Mengen von 1,0 – 1,25 g für 100 ml Endvolumen eingewogen. Als Lösungsmittel für Testsubstanzen und Faeces diente ein Kaliumphosphatpuffer (KP-Puffer: 0,1 M; pH = 7,0).

Die Faecesproben wurden frisch von mindestens drei gesunden Spendern gesammelt, auf Eis gekühlt und unverzüglich abgewogen. Anschließend wurden die Faecesproben in einen Homogenisierungsbeutel (SEWARD Stomacher Bags, UK) überführt und im Verhältnis 1:5 (w/v) mit dem KP-Puffer in einem Stomacher'400 Circulator (SEWARD, UK) für 3 min bei 200 rpm homogenisiert. Letzte grobe Festpartikel der Faecessuspension wurden durch Sieben abgetrennt.

Die Testsubstanzen wurden nach der Einwaage in die Fermentationsgefäße (500 ml Glasflaschen) überführt und mit 50 ml KP-Puffer gelöst. Als Negativkontrolle (Blank) wurden 50 ml KP-Puffer ohne Probenzusatz benutzt. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Faecessuspension zugegeben (Endvolumen: 100 ml), wodurch der Faecesanteil im System 10% erreichte [Barry et al., 1995].

Nach dem luftdichten Verschließen der Fermentationsgefäße mit Gummistopfen erfolgte über Schläuche und Injektions-Kanülen, welche durch die Gummistopfen gestochen wurden, die Einstellung der anaeroben Atmosphäre. Abwechselnd wurde dabei zuerst Luft über eine Vakuumpumpe aus den Fermentationsgefäßen bis zu einem Unterdruck von 0,5 bar abgeleitet und anschließend ein Fermentations-Gasgemisch (10% CO₂; 10% H₂; 80% N₂) mit einem Überdruck von 0,8 bar eingeleitet. Nach 30 min bzw. 15 Zyklen (1 Zyklus = 1 min Luft absaugen + 1 min Begasung) konnten die Kanülen wieder entfernt und die Flaschen für 24 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert werden.

Nach 24 h wurden die Verschlussstopfen entfernt, die Fermentationssuspension in 50 ml Falcon-Tubes überführt und um die Fermentation zu stoppen sowie aerobe Reaktionen zu vermeiden, sofort auf Eis gekühlt. Zusätzlich wurde der pH-Wert der Proben dokumentiert. Anschließend erfolgte die Gewinnung der Fermentations-überstände, indem Festpartikel, Schweb- und Trubstoffe, durch Zentrifugation für

30 min und erneute 15 min bei 4.500 U/min und 4°C, aus der Faecessuspension abgetrennt wurden. Der gewonnene Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Vor Verwendung in der Zellkultur erfolgte eine Sterilfiltration mittels sterilen Spitzenvorsatzfiltern (0,22 µm) aus hydrophilem Zelluloseester (Fisherbrand). Die sterilfiltrierten Fermentationsüberstände wurden bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 one-Batch in vitro-Fermentation mit vorheriger Simulation des oberen Gastrointestinaltraktes

[„neue“ Fermentationsmethode – NFM]

2.2.2.3.1 Prinzip

Im Gegensatz zu der Fermentation nach Barry et al. [1995], werden die Testsubstanzen einer Simulation des gesamten Gastrointestinaltraktes unterzogen. Den drei primären Orten der Verdauung entsprechend, Magen, Dünn- und Dickdarm, erfolgt die Simulation des GIT in drei Phasen. Durch Zugabe von Enzymen, Änderung von pH-Wert und Sauerstoffgehalt der umgebenden Atmosphäre wird das System an die jeweiligen Gegebenheiten im GIT angepasst, bevor mit der Zugabe der Faecessuspension die eigentliche Fermentation (24h), als abschließender Verdauungsprozess, gestartet wird. Die Simulation der drei Phasen wird konstant bei 37°C durchgeführt.

2.2.2.3.2 Durchführung

Die Einwaage der Testsubstanzen und die Präparation der Faecessuspension erfolgte wie unter [Pkt. 2.2.2.2.2] beschrieben.

Die Fermentation wurde basierend auf dem von Molly et al. [1993] entwickelten SHIME-Modells durchgeführt. Dementsprechend wurde anstatt des KP-Puffers eine Variation [Macfarlane et al., 2005] des ebenfalls von Molly et al. [1993] entwickelten Nährmediums verwendet (siehe Anhang Seite 88). Zusätzlich wurde für die Simulation des Dünndarms (Phase 2) als Verdauungssekret das sogenannte „intestinales Extrakt“ (siehe Anhang Seite 88) [De Boever et al., 2000b; Meddah et al., 2001] dem System zugeführt, wodurch sich der prozentuale Volumenanteil der

Komponenten der resultierenden Fermentationssuspension im Vergleich zu der Fermentation nach Barry et al. [1995] verändert. Nach der Überführung der Testsubstanzen in die Fermentationsgefäße wurden sie in 33,3 ml Nährmedium gelöst, was einem Drittel des resultierenden Endvolumens an Fermentations-suspension (100 ml) entsprach. Für die Negativkontrolle (Blank) wurde ein Fermentationsgefäß ohne Testsubstanz mitgeführt.

Zum Start der Magensimulation wurde der pH-Wert, durch Zugabe von HCL (2N), auf pH=2 gesenkt und die Fermentationsgefäße, nachdem sie mit einem Gummistopfen verschlossen wurden, ins Schüttelwasserbad (37°C) gestellt. Die Dauer der Magensimulation betrug 2 h.

Mit Beginn der Dünndarmsimulation wurden dem System 16,6 ml intestinales Extrakt zugeführt (1/6 des resultierenden Endvolumens an FS von 100 ml). Entsprechend der plötzlichen Milieu-Änderung im Bereich des proximalen Duodenums kommt es mit der Zugabe des intestinalen Extraktes zu einem Anstieg des pH-Wert auf 5-6. Mittels NaOH (10N) wurde der pH-Wert = 6,5 und durch Begasung mit Fermentationsgasgemisch [Pkt. 2.2.2.2.2] eine halb-anaerobe Atmosphäre (6-7 Begasungszyklen) eingestellt. Die Dauer der Dünndarmsimulation betrug 3 h und wurde konstant bei 37°C im Schüttelwasserbad durchgeführt.

Direkt im Anschluss erfolgte durch die Zugabe von 50 ml Faecessuspension und der einheitlichen Einstellung eines pH-Wertes von 6,5 der Start der Kolonsimulation bzw. der eigentlichen Fermentation. Die Fermentationssuspension wurde bis zum Erreichen einer strikt anaeroben Atmosphäre erneut mit Fermentationsgasgemisch begast. Die Dauer der Fermentation betrug 24 h bei 37°C. Die nach Ablauf der 24 h anschließende Gewinnung der Fermentationsüberstände erfolgte wie unter [Pkt. 2.2.2.2.2] beschrieben.

Bereits vor der Magensimulation erfolgte die Herstellung der Faecessuspension (Faecesproben + Nährmedium im Verhältnis 1:5 (w/v)). Während der 5-stündigen Simulation von Magen und Dünndarm wurde die Faecessuspension bzw. die Mikroflora in dem Nährmedium durch Einstellung einer anaeroben Atmosphäre und Lagerung bei 37°C in einem Fermentationsgefäß stabilisiert.

2.2.3 Messung des Fett- & Gallensäuregehaltes

2.2.3.1 Quantifizierung der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA)

Die gaschromatographische Analyse der in den Fermentationsüberständen enthaltenen kurzkettigen Fettsäuren erfolgte nach Vorgaben von Kießling et al. [2002] am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Nach dem Auftauen wurden 500 µl der Überstände mit je 50 µl eines iso-Caprönsäurestandards (0,89 g / 100 ml konzentrierter Ameisensäure) versetzt, 30 s geschüttelt und zentrifugiert (6400 x g, 10 min, 4°C). Danach wurde je 1 µl der Proben injiziert und bei 250°C verdampft. Als Trägergas diente Wasserstoff (H₂).

Die gaschromatographische Messung (Shimadzu GC 17A) erfolgte mit einer 15 m-FFAP-Säule unter Durchführung eines Temperaturgradienten (Starttemperatur 105°C, Trägergas: H₂O). Eine Tabelle mit den zusammengefassten technischen Daten dieser Analysemethode ist im Anhang (Seite 98) zu finden. Nach Abgleich der Messwerte mit dem iso-Caprönsäurestandard konnten die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren bestimmt und mittels GCsolution Software (Shimadzu) berechnet werden.

2.2.3.2 Quantifizierung der Gallensäuren (GS)

Die Durchführung erfolgte ebenfalls nach einer vom Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie entwickelten Methode [Keller & Jahreis, 2004]. Das Verfahren dient der Bestimmung des Gesamtsterol- und Gallensäuregehaltes von Fermentationsüberständen oder humanen Faeceswasserproben. Den ersten Schritt bildet die Sterolextraktion. Dabei wurde zunächst 1 ml des Fermentationsüberstandes mit 1 ml 1M ethanolischer Natronlauge (90%) bei 70°C für 1 h hydrolysiert. Anschließend erfolgte 4malig die Extraktion freier Sterole durch jeweilige Zugabe von 1 ml Cyclohexan. Nachdem die sterolhaltigen Fettphasen verworfen wurden, erfolgte eine 3-stündige Hydrolyse der wässrigen Phase mit 200 µl 10 M Natronlauge bei 120°C. Danach wurde mit 25%iger Salzsäure ein pH-Wert von pH=1 eingestellt und anschließend die freien Gallensäuren mit 4mal je 1 ml Diethylether extrahiert und die gewonnenen Extrakte vereinigt. Nach Zugabe von 10 µg internen Standards

(Hyodeoxycholsäure) wurde das Extrakt bis zur Trockne mit einem Stickstoffstrom bei 40°C abgedampft. Mit 650 ml Dimethoxypropan, 950 µl Methanol und 50 µl methanolischer Salzsäure (3N, Supelco) wurden die Gallensäuren anschließend bei 50°C für 45 min methyliert und darauf erneut mit einem Stickstoffstrom getrocknet (40°C). Nach der Methylierung erfolgte die 1-stündige Silylierung mit 150 µl Sylon® (Hexamethyldisilazan: Trimethylchlorsilan: Pyridin = 3:1:9) bei 90°C und die anschließende Trocknung mit Stickstoffstrom (40°C). Der Rückstand wurde in 200 µl Decan aufgenommen, 10 min im Ultraschallbad behandelt, 20 min zentrifugiert und in GC-Vials überführt. Die GC-MS-Messung (GC17-QP5000) erfolgte mit einer ZB-5ms Guardian-Säule unter Durchführung eines Temperaturgradienten (Starttemperatur 280°C, Trägergas: Helium). Eine Tabelle mit den zusammengefassten technischen Daten dieser Analysemethode ist im Anhang (Seite 99) zu finden. Nach Abgleich der Messwerte mit dem Hyodeoxycholsäurestandard (Kalibration im Multi Ion Chromatogram – MIC) konnten die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren bestimmt und mittels Class 5000 Software (Shimadzu) berechnet werden.

2.2.4 Messung des Ammoniakgehaltes

2.2.4.1 Prinzip

Die Bestimmung des Ammoniakgehaltes basiert auf der Grundlage der Indophenol- oder Berthelot-Reaktion, welche nach ihrem Entdecker Marcellin Berthelot benannt wurde. Durch Chlorierung des Ammoniaks im alkalischen Milieu (Chlorierungsmittel = Natrium-Hypochlorid) zum Monochloramin und anschließender Reaktion mit Phenol, in Gegenwart eines Katalysators (Natrium-Nitroprussid), entsteht das blaugefärbte Indophenol-Ion. Das in Abhängigkeit vom Ammoniakgehalt gebildete Indophenol-Ion kann photometrisch bestimmt werden. [Chaney & Marbach, 1962]

2.2.4.2 Durchführung

Um den Ammoniakgehalt der Testsubstanzen photometrisch quantifizieren zu können, wurde parallel zu den Messungen eine Standard-Kalibriergerade mit Ammoniumchlorid in den Konzentrationen 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 und 10 mM erstellt (Abb. 2-1). Die Herstellung der für die Durchführung benötigten Lösungen und Verdünnungen erfolgte mit aqua bidest. als Lösungsmittel.

Zu Beginn wurde eine 1:100 Verdünnung der jeweiligen Testsubstanz (1:10 vorverdünnt) in 50 ml Falcon Tubes hergestellt. Anschließend wurden jeweils 2 ml der Reaktionslösungen A und B (siehe Anhang S. 96) hinzugegeben und die Tubes für 10 min bei 60°C ins Wasserbad gestellt. Nachdem sich die Proben unter dem Abzug auf Raumtemperatur abgekühlt hatten, erfolgte die Übertragung in 96MTP (200 µl pro Kavität / mindestens Dreifachbestimmung). Die Extinktion des gebildeten Indophenol-Farbkomplexes wurde bei 630 nm im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer gemessen.



Abb. 2-1:

Basierend auf der Indophenol-Reaktion erstellte Standardreihe mit Ammoniumchlorid (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 mM) für die Bestimmung des Ammoniakgehaltes von Fermentationsüberständen.

2.2.5 Messung der akuten Zytotoxizität

Die Messung der akuten Zytotoxizität der Testsubstanzen erfolgte mit den HT29-Zellen. Nach der Zellernte und der Bestimmung der Vitalität wurde eine Zellzahl von 4 Mio Zellen pro ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde zu 200 µl aliquotiert und mit 200 µl der Testsubstanzen, in den Konzentrationen 0, 5, 10, 20 und 50% (v/v), im Thermomixer bei 37°C inkubiert. Die Herstellung der Zellsuspension und die Verdünnung der Testsubstanzen erfolgten mit RPMI-Medium. Nach 30, 60, 120 und 240 min wurden 20 µl der Inkubationslösung entnommen und die Zellzahl und Vitalität mittels CASY®-Zellzähler bestimmt.

2.2.6 Messung der Proliferation kultivierter Zellen (DAPI-Assay)

2.2.6.1 Prinzip

Die Quantifizierung der Zellzahl und somit des relativen Wachstums der HT29-Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen basiert auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes *4'6-Diamidino-2-phenylindol* (DAPI) an die doppelsträngige DNA. Im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer (Tecan, Deutschland) kann die Zellmenge bzw. der DNA-Gehalt, basierend auf der Komplexbildung zwischen DNA und DAPI, als Veränderung der Fluoreszenz erfasst werden.

2.2.6.2 Durchführung

2.2.6.2.1 Aussaat der Zellen und Applikation der Testsubstanzen

Die in Zellkulturflaschen (75 cm²) gewachsenen Zellen wurden steril geerntet und anschließend deren Zellzahl und Vitalität [siehe pkt. 2.2.1.1] bestimmt. In Abhängigkeit von der für die Messung benötigten Anzahl an 96-Well-Mikrotiterplatten (96MTP) wurde anschließend die entsprechende Menge an Zellsuspension, mit einer relativen Zellzahl von 160000 Zellen pro ml, hergestellt. Bei einem Aussaatvolumen von 50 µl entsprach dies 8000 Zellen pro Kavität einer 96MTP. Die äußeren Wells der 96MTP wurden statt der Zellsuspension mit 50 µl DMEM gefüllt und dienten bei der Auswertung als Leer- und Kontrollwert, um eine Eigenfluoreszenz der

Testsubstanzen oder Kontaminationen auszuschließen. Nach der Aussaat wurden die Zellen 24 h unter standardisierten Bedingungen im Brutschrank kultiviert und anschließend jede einzelne MTP unter dem Mikroskop überprüft. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Testsubstanzen unter sterilen Bedingungen. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe in DMEM wurden 50 µl der jeweiligen Testsubstanzenkonzentrationen (doppelt konzentriert) auf 50 µl Mediumüberstand und Zellen aufgebracht. Sterilfiltrierte Fermentationsüberstände in den Konzentrationen 2,5; 5; 10 und 20% (v/v), die Mediumkontrolle ohne Testsubstanz sowie in Medium gelöstes Butyrat (5 und 10 mM) als Positivkontrolle wurde appliziert.

2.2.6.2.2 Fluoreszenzphotometrische Auswertung

Nach Beendigung des Inkubationszeitraums im Brutschrank (24, 48 und 72 h) und der anschließenden Bestimmung der metabolischen Aktivität (siehe Kap. 2.2.5), wurde der Überstand in den Wells vollständig abgenommen und jeweils 100 µl Methanol auf die Zellen gegeben. Hierdurch wurden die Zellen abgetötet und zusätzlich auf dem Plattenboden fixiert. Nach 5 min wurde das Methanol durch abschütten und 15-minütige Trocknung der 96 MTP ohne Deckel entfernt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 100 µl frisch hergestellter DAPI-Färbelösung pro well. Nach 30 min konnte die Ausbildung des DNA-DAPI-Komplexes im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer gemessen werden. Die Messparameter zeigt Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1:
Messparameter der fluoreszenzphotometrischen Auswertung (DAPI-Assay)

DAPI-Assay	
Messmodus	Fluoreszenz
Temperatur	37°C
Anregungswellenlänge	360 nm
Emissionswellenlänge	465 nm
Gain	60 (µs)
Anzahl der Anregungen	3
Lesemodus	Boden, mehrere Messpunkte

Das Fluorochrom DAPI wird durch energiereiches Licht der Wellenlänge $\lambda_A = 360 \text{ nm}$ angeregt. Die aufgenommene Energie wird in Form längerwelligen Lichts ($\lambda_E = 465 \text{ nm}$) von den Elektronen des DAPI-Moleküls abgegeben (Emmission) und ist als Fluoreszenz messbar. Dabei ist die Fluoreszenz des an die doppelsträngige DNA gebundenen Fluorochroms um das 20-fache erhöht. Nach Subtraktion des Substanzleerwerts (Randwells der 96MTP mit Testsubstanz und Medium ohne Zellen) vom Mittelwert der Dreifachbestimmung wurde das Verhältnis zur Mediumkontrolle berechnet.

2.2.7 Messung der metabolischen Aktivität kultivierter Zellen (CTB-Assay)

2.2.7.1 Prinzip

Die Quantifizierung der metabolischen Aktivität der HT29-Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen basiert auf der Messung der Fluoreszenz des stark fluoreszierenden rosa Farbstoffs Resorufin, welcher als Resultat der Verstoffwechslung von Resazurin durch reduzierende Enzyme der Zellen gebildet wird. Als resazurinreiches Ausgangssubstrat dient die CellTiter®-Blue-Reagenz (CTB). Die CTB-Messung kann parallel mit dem DAPI-Assay durchgeführt werden.

2.2.7.2 Durchführung

2.2.7.2.1 Aussaat der Zellen und Applikation der Testsubstanzen

[Siehe Pkt. 2.2.6.2.1]

Die CTB- und DAPI-Messung erfolgte im gleichen zellulären Testsystem.

2.2.7.2.2 Fluoreszenzphotometrische Auswertung

Zwei Stunden vor Ablauf des Inkubationszeitraums (24, 48 und 72 h) wurden 20 μl der CellTiter®-Blue-Reagenz zu jedem Well der 96MTP pipettiert. Anschließend wurden die 96 MTP kurz geschwenkt und zurück in den Brutschrank gestellt, wo unter standardisierten Bedingungen die Reduzierung des Resazurins durch die

Zellen für die restlichen 2 h erfolgte. Im direkten Anschluss wurden die 96MTP fluoreszenzphotometrisch ausgewertet. Die Messparameter zeigt Tabelle 2-2.

Tabelle 2-2:
Messparameter der fluoreszenzphotometrischen Auswertung (CTB-Assay)

CTB-Assay	
Messmodus	Fluoreszenz
Temperatur	37°C
Anregungswellenlänge	520 nm
Emissionswellenlänge	595 nm
Gain	45 (µs)
Anzahl der Anregungen	3
Lesemodus	Boden, mehrere Messpunkte

Der Farbstoff Resorufin wird durch energiereiches Licht der Wellenlänge $\lambda_A = 520 - 560$ nm angeregt. Die aufgenommene Energie wird in Form längerwelligen Lichts ($\lambda_E = 595$ nm) von den Elektronen des Resorufins abgegeben (Emmission) und ist als Fluoreszenz messbar. Nach Subtraktion des Substanzleerwerts (Randwells der 96MTP mit Testsubstanz und Medium ohne Zellen) vom Mittelwert der Dreifachbestimmung wurde das Verhältnis zur Mediumkontrolle berechnet. Die Ergebnisse wurden auf den dazugehörigen Proliferationswert bezogen, welcher direkt nach der fluoreszenzphotometrischen Messung des Resorufins durch Behandlung mit DAPI [siehe Pkt. 2.2.6.2.2] ermittelt wurde.

2.2.8 Messung genotoxischer Schäden (Comet Assay)

2.2.8.1 Prinzip

Der Comet Assay ist auch unter dem Namen Einzelzellgelelektrophorese bekannt. Es handelt sich um eine schnelle, einfache und sensitive Methode, um primäre DNA-Schäden quantitativ auf der Einzelzellebene zu bestimmen. Sowohl DNA-Doppelstrangbrüche, Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, Basenaddukte, veränderte Basen wie auch die DNA-Reparatur kann quantitativ erfasst werden [Tice et al., 2000].

Beim Comet Assay werden die zu untersuchenden Zellen, nach der Inkubation mit der zu analysierenden Testsubstanz, in einer dünnen Agaroseschicht fixiert. Nach einer Lyse der Zellmembranen werden die Zellen beim alkalischen Comet Assay in einem Elektrophoresepuffer (ca. pH=13) inkubiert. Hierbei kommt es in Folge einer Denaturierung zur Bildung entwundener, einzelsträngiger DNA, welche dabei, in Abhängigkeit einer genotoxischen Vorschädigung (Einzel- & Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen), in Fragmente zerlegt wird. Anschließend wird die negativ geladene DNA einem elektrischen Feld ausgesetzt und bewegt sich in Richtung Anode. Ungeschädigtes Chromatin liegt in einer hochgeordneten dichten Packung der DNA-Schleifen vor und kann in dieser Form nicht im elektrischen Feld durch das Agarose-Gel wandern. Die geschädigte, fragmentierte DNA wiederum wandert in Abhängigkeit von der Größe der Fragmente durch die Gelmatrix in Richtung Anode. Nach der Elektrophorese werden die Objektträger neutralisiert und die DNA mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) angefärbt. Die optische Erscheinung ungeschädigter DNA als heller Kreis sowie die Kometenform gewanderter DNA-Fragmente mit restlich verbliebener Kern-DNA ermöglichen eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung. Der relative Anteil der DNA im Kometenschweif zur Gesamt-DNA („Tail Intensity“ in %) dient als Maß für die genotoxische Schädigung.

2.2.8.2 Durchführung

Die Objektträger wurden zunächst mit Agarose vorbeschichtet (2mal mit „normal melting agarose“ (NMA)) und bis zum Versuch im Kühlschrank aufbewahrt. Am Versuchstag wurden zu Beginn die Lyselösung und der Elektrophoresepuffer frisch angesetzt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Nach der Ernte der HT29-Zellen und der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung (CASY-Zellzähler), wurde eine Entsprechende Menge Zellsuspension mit einer relativen Zellzahl von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit RPMI hergestellt und zu jeweils 100 µl aliquotiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Aliquote mit ebenfalls 100 µl der Testsubstanzen (doppelt konzentriert mit RPMI hergestellt) für eine Stunde bei 37°C im Thermomixer. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze für 5min bei 2000 rpm abzentrifugiert und in 200 µl RPMI resuspendiert. 20 µl der Suspension wurden daraufhin zur Zellzahl- und

Vitalitätsbestimmung abgenommen. Nach erneutem Abzentrifugieren der Zellen (2000 rpm, 5 min) und Verwerfen des Überstandes erfolgte eine Resuspendierung des Pellets in 90 µl LMA („low melting agarose“). Für eine Dreifachbestimmung wurden die in Agarose eingebetteten Zellen möglichst gleichmäßig, dreifach pro Objektträger, aufgetragen, mit einem Deckglas verteilt und nach der Aushärtung auf einer Eisbox mit zusätzlichen 85 µl LMA überschichtet. Nach erneutem Aushärten der Agarose und dem anschließenden Entfernen des Deckglases, wurden die Objektträger in eine Lysekammer gestellt und mindestens 1 h in der 4°C kalten LyseLösung (Hochsalz, nicht-ionische Detergens mit Triton-X 100) aufbewahrt. Im Anschluss an die Lyse erfolgten die Entwindung der fixierten DNA im alkalischen Milieu und die Elektrophorese mit den Objektträgern. Dazu wurden diese zunächst in die Elektrophoresekammer gelegt und nach Zugabe des alkalischen Elektrophoresepuffers 20 min inkubiert, ehe sich die ebenfalls 20-minütige Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V anschloss. Die Stromstärke (etwa 300 mA) wurde über die Menge des zugegebenen, elektrolythaltigen Elektrophoresepuffers reguliert. Anschließend erfolgte die Neutralisation der Objektträger durch dreimaliges Spülen (jeweils 5 min Einwirkzeit) mit Neutralisationspuffer. Nach kurzer Trocknung wurde die fixierte DNA mit 15 µl SYBR-Green-Lösung pro Auftragungspunkt gefärbt. Die Auswertung der kühl gelagerten Objektträger (4°C) erfolgte mit einem ZEISS Axiolab HB50-Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera. Pro Objektträger wurden insgesamt 150 Zellen aus drei verschiedenen Bereichen gemessen. Als Auswertekriterium wurde die Tail intensity (prozentualer Anteil der DNA im Schweif) genutzt.

2.2.9 Statistik

Alle statistischen Überprüfungen der Ergebnisse wurden mit Graph Pad Prism® 4.0 durchgeführt. Die nach zwei unterschiedlichen Fermentationsverfahren gewonnenen Fermentationsüberstände mit drei Testsubstanzen und einem Blank wurden untereinander und miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Untersuchungen entstammen jeweils aus drei oder mehr unabhängigen Wiederholungen. Hierbei wurden die Mittelwerte der Kontrollen und Testsubstanzen mittels two-way-ANOVA mit Bonferoni post test auf signifikante Unterschiede getestet.

3 Ergebnisse

Die one-Batch in vitro-Fermentation nach Barry et al. [1995] (Alte Fermentationsmethode - AFM) und die one –Batch in vitro-Fermentation mit gastrointestinaler Simulation (Neue Fermentationsmethode - NFM) wurden in 3 unabhängigen Versuchen, mit 3 verschiedenen Testsubstanzen (Inulin, Apfelpolyphenol-Extrakt [AS05], Weizenkleie [WK]) und der Negativkontrolle (Blank), parallel durchgeführt. Faecesproben von 3 verschiedenen Probanden wurden zu Beginn jedes der 3 Versuchstage frisch gesammelt und zu gleichen Anteilen für die parallel durchgeführte AFM und NFM verwendet.

3.1 pH-Werte der Fermentationssuspensionen

Direkt nach Ablauf der 24-stündigen Fermentation erfolgte die erste Charakterisierung des Fermentationsergebnisses durch Bestimmung der jeweiligen pH-Werte in der Fermentationssuspension (FS).

Der pH-Wert wurde durch jede der drei Testsubstanzen, sowohl nach der AFM als auch nach der NFM, signifikant gegenüber dem Blank gesenkt ($p < 0,001$ für jede FS Testsubstanz nach AFM & NFM). Im Vergleich beider Methoden konnte in den Fermentationssuspensionen der NFM ein um ca. 0,25 – 0,5 signifikant niedrigerer pH-Wert gegenüber der AFM festgestellt werden (Tab. 3-1).

Tabelle 3-1:
pH-Werte der jeweiligen Fermentationssuspension (FS) direkt nach Beendigung der *in vitro* Fermentation (MW + SD, n=3). Dargestellt sind signifikante Unterschiede zwischen den Fermentationsmethoden (FM). Die Berechnung erfolgte mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

	AFM	NFM	FM im Vergleich
FS Blank	6,47 ± 0,06	5,94 ± 0,07	***
FS WK	5,97 ± 0,04	5,53 ± 0,04	***
FS AS05	5,62 ± 0,16	5,33 ± 0,05	***
FS Inulin	5,17 ± 0,05	4,91 ± 0,05	**

3.2 Fett- & Gallensäuregehalt der Fermentationsüberstände

3.2.1 Kurzkettige Fettsäuren (SCFA)

Durch die Bildung kurzkettiger Fettsäuren lassen sich Aussagen über das Auftreten und die Intensität einer mikrobiellen Fermentation treffen. In Abhängigkeit von dem zu fermentierenden Substrat können spezifische Fettsäuremuster ermittelt werden. Die Ergebnisse der durchgeführten FM sind im Folgenden einzeln für jede der Testsubstanzen in Abbildung 3-1 bis 3-3 und zusammenfassend in Tabelle 3-2 dargestellt. Zusätzlich wurden das Verhältnis der drei primär gebildeten Fettsäuren Acetat, Propionat und n-Butyrat bestimmt.

Allgemein lässt sich, bei Betrachtung der Gesamtkonzentration an gebildeten SCFA, in allen Fällen eine stärkere SCFA-Bildung durch die nach dem „neuen“ Verfahren durchgeführte Fermentation (NFM) feststellen.

3.2.1.1 Fermentation mit Inulin

Die FÜ Inulin führten in der Summe aller SCFA-Konzentrationen, sowohl nach „neuer“ als auch nach „alter“ Fermentationsanordnung, zu einer signifikanten Erhöhung gegenüber dem Blank (Abb. 3-1). Allerdings ist die Differenz zwischen dem FÜ Blank(AFM) und dem FÜ Inulin(AFM) weitaus größer (Tab. 3-2), was im Gegensatz zum FÜ Inulin(NFM) vor allem aus einer gegenüber dem Blank hohen Acetat-Konzentration resultiert. Eine signifikante Steigerung der Butyrat-Konzentration gegenüber dem Blank konnte sowohl in FÜ Inulin(AFM) als auch in FÜ Inulin(NFM) festgestellt werden. Das Acetat:Propionat:n-Butyrat Verhältnis betrug 59:13:24 im FÜ Inulin(AFM) und 45:16:37 im FÜ Inulin(NFM).

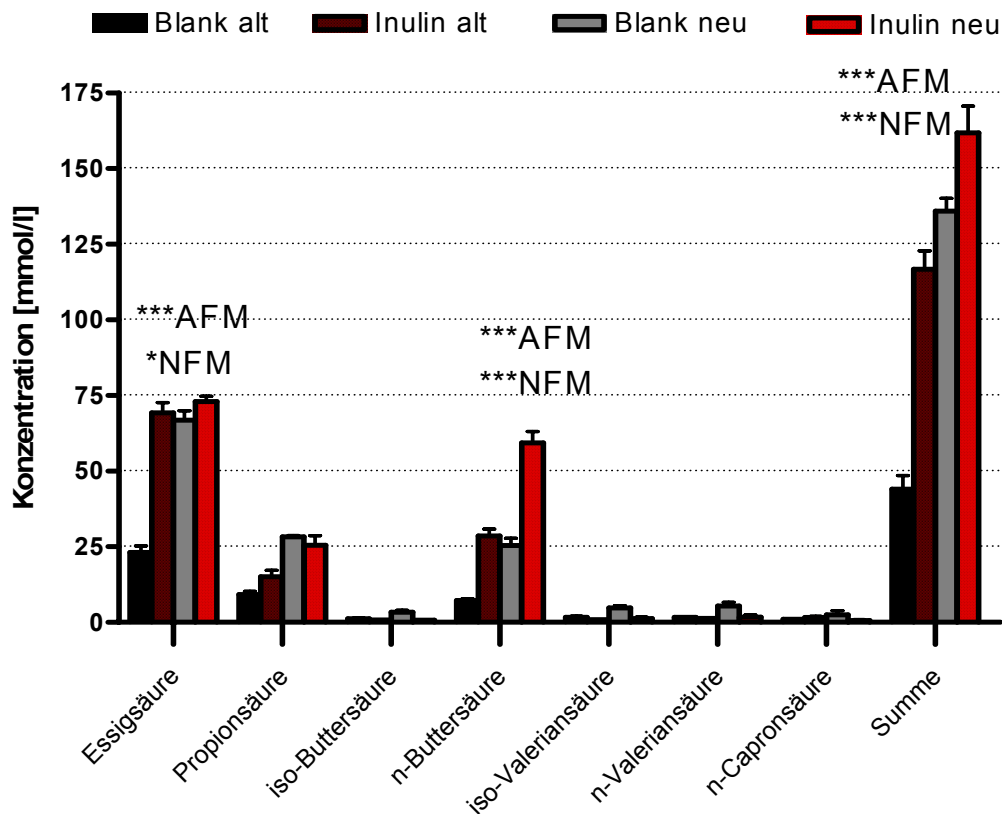


Abb. 3-1:

SCFA-Konzentrationen der FÜ AFM (Blank, Inulin) & FÜ NFM (Blank, Inulin). Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen dem FÜ Blank und dem FÜ Inulin der jeweiligen FM. Die Unterschiede wurden für jede SCFA mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test berechnet. (MW+SD, n=3) *p<0,05, ***p<0,001

3.2.1.2 Fermentation mit AS05

Im Falle des FÜ AS05(NFM) konnte nur eine signifikante Steigerung der Acetat-Konzentration gegenüber dem Blank festgestellt. Andererseits war die Propionat-Konzentration des FÜ Blank(NFM) mit 28,13 mmol/l gegenüber 21,97 mmol/l des FÜ AS05(NFM) sogar signifikant erhöht (Abb. 3-2). In der Summe aller SCFA-Konzentrationen konnte der FÜ AS05(NFM) mit 132,45 mmol/l zwar mehr als doppelt so viele SCFA aufweisen als der FÜ AS05(AFM) (=62,17 mmol/l), der Wert des FÜ Blank(NFM) lag mit 135,89 mmol/l allerdings sogar knapp über dem Wert des FÜ AS05(NFM), wodurch in der Summe keine SCFA-steigernde Wirkung durch eine Fermentation mit AS05 nach „neuer“ Fermentationsmethode feststellbar war. Acetat, und in dessen Folge auch die Gesamt-SCFA-Konzentration, waren im FÜ AS05(AFM) signifikant gegenüber dem Blank erhöht.

Das Acetat:Propionat:n-Butyrat Verhältnis betrug 65:12:12 im FÜ AS05(AFM) und 59:17:19 im FÜ AS05(NFM).

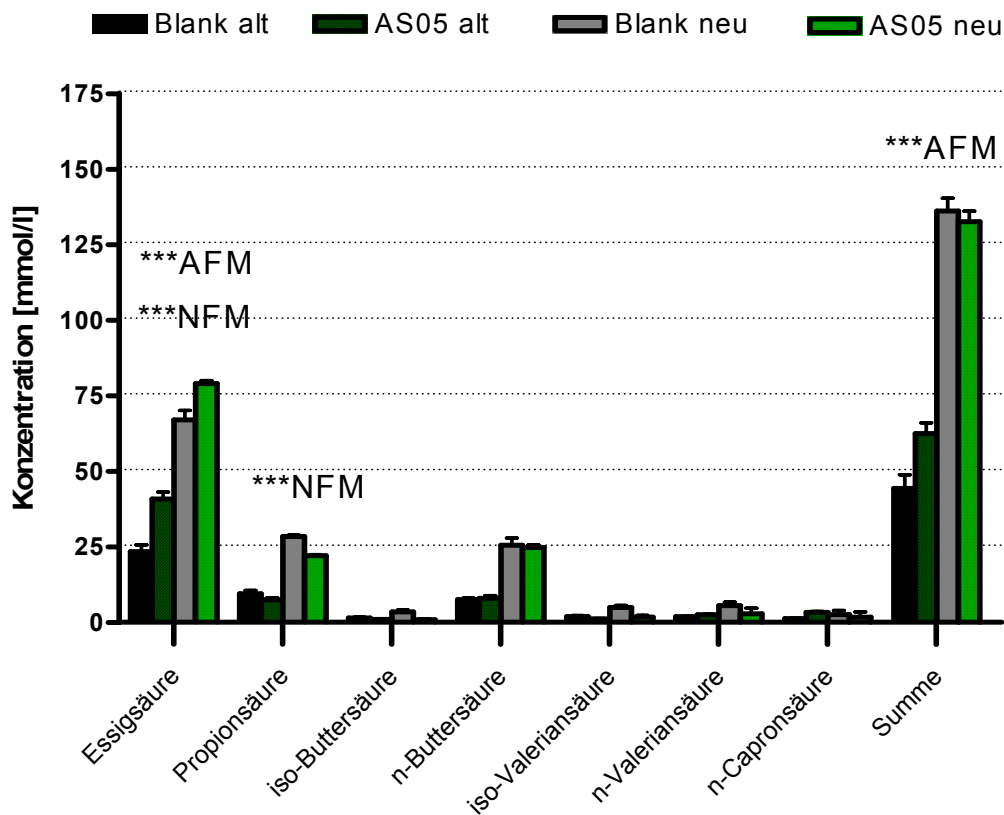


Abb. 3-2:

SCFA-Konzentrationen der FÜ AFM (Blank, AS05) & FÜ NFM (Blank, AS05). Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen dem FÜ Blank und dem FÜ AS05 der jeweiligen FM. Die Unterschiede wurden für jede SCFA mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test berechnet. (MW+SD, n=3) ***p<0,001

3.2.1.3 Fermentation mit WK

Die Fermentation von WK führte nach Durchführung der AFM zu einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen von Acetat, Propionat und Butyrat sowie nach Durchführung der NFM zu einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen von Acetat und Butyrat im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-3). In dessen Folge erhöhte sich auch die Gesamt-SCFA-Konzentration durch die Fermentation mit WK (AFM & NFM) signifikant. Der FÜ WK(NFM) wies dabei sowohl im Falle der drei primär gebildeten Fettsäuren, als auch in der Summe (161,5 mmol/l gegenüber 84,97 mmol/l) in etwa die doppelten Konzentrationswerte gegenüber dem FÜ WK(AFM) auf. Das Acetat:Propionat:n-Butyrat Verhältnis betrug 54:19:17 im FÜ WK(AFM) und 48:19:23 im FÜ WK(NFM).

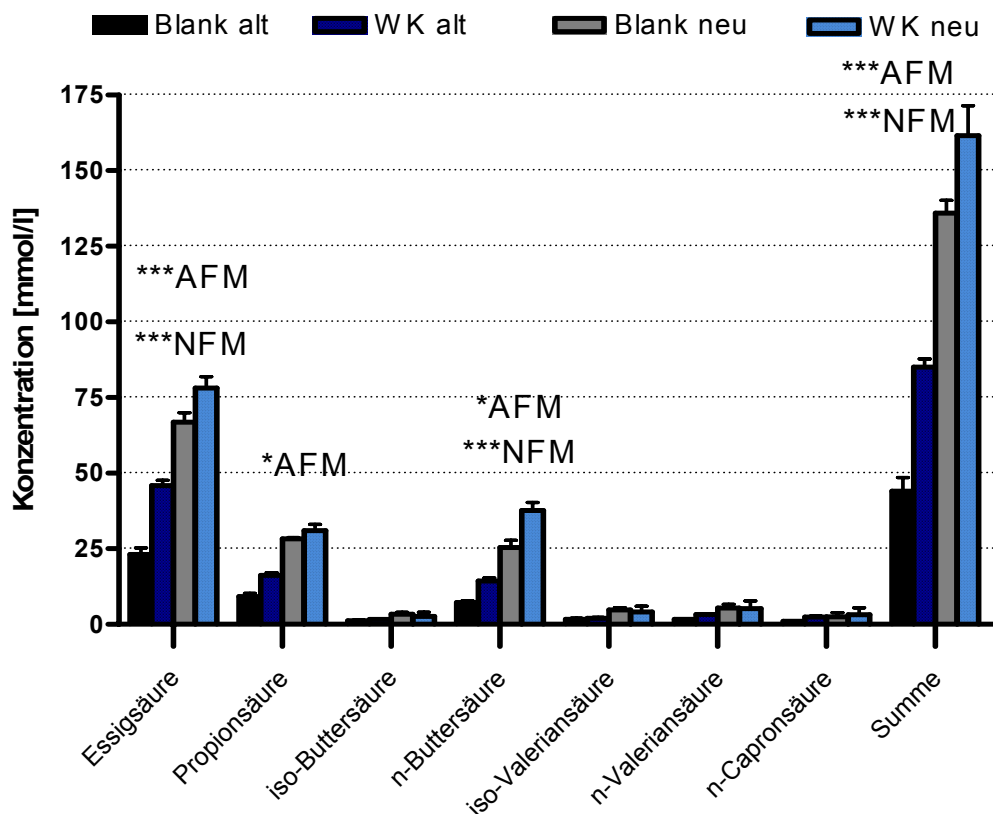


Abb. 3-3:

SCFA-Konzentrationen der FÜ AFM (Blank, WK) & FÜ NFM (Blank, WK). Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen dem FÜ Blank und dem FÜ WK der jeweiligen FM. Die Unterschiede wurden für jede SCFA mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test berechnet. (MW+SD, n=3) *p<0,05, ***p<0,001

3.2.1.4 Vergleich des SCFA-Gehaltes der FÜ nach Abzug der Blank-Werte

Zur Verdeutlichung des effektiv gebildeten Anteils an SCFA nach der Fermentation mit den Testsubstanzen werden die SCFA-Konzentrationen der einzelnen FÜ Testsubstanzen nach Subtraktion ihres dazugehörigen Blank-Wertes (AFM bzw. NFM) nachfolgend in Tabelle 3-2 verglichen.

Die durch die AFM gewonnenen FÜ weisen, nach Abzug des Blank-Wertes, eine signifikant größere Gesamt-SCFA-Konzentration gegenüber den FÜ der NFM auf. Im Falle des Inulin erweist sich, neben der signifikanten Erhöhung der Propionatkonzentration, die ca. um den Faktor 8 erhöhte Acetatkonzentration des FÜ Inulin(AF) gegenüber des FÜ Inulin(NF) als besonders auffällig. Andererseits führte die Fermentation des Inulins nach dem „neuen“ Verfahren zu

einer signifikanten Erhöhung der Butyratkonzentration gegenüber des FÜ Inulin(AFM) nach Subtraktion des Blank-Wertes. Betrachtet man die Ergebnisse der Fermentation mit AS05 fällt auf, dass in dem FÜ AS05(NFM,) außer im Falle des Acetats, weniger SCFA gegenüber dem FÜ Blank(NFM) gebildet wurden. Der FÜ WK(AFM) weist, ähnlich der FÜ Inulin, eine signifikant erhöhte Acetat-konzentration gegenüber dem FÜ WK(NFM) nach Abzug des Blank Wertes auf.

Tabelle 3-2:

Vergleich des SCFA-Gehaltes verschiedener, nach „alter“ (AFM) und „neuer“ Fermentationsmethode (NFM) gewonnener Fermentationsüberstände. Angegeben ist die SCFA-Konzentration in mmol/l nach Subtraktion der Werte des FÜ-Blank von denen der FÜ-Testsubstanz gleicher FM. Für jede Testsubstanz (MW+SD, n=3) sind signifikante Unterschiede zwischen AFM & NFM dargestellt.

two-way-ANOVA/Bonferroni post test **p<0,01, ***p<0,001

	Inulin AFM	Inulin NFM	Signifikanz	AS05 AFM	AS05 NFM	Signifikanz	WK AFM	WK NFM	Signifikanz
Essigs.	46,11 ± 3,29	6,27 ± 4,4	***	17,48 ± 4,32	12,08 ± 2,14		22,80 ± 1,8	11,36 ± 0,68	***
Propions.	5,98 ± 2,86	-2,70 ± 2,7	**	-1,76 ± 1,55	-6,16 ± 0,72		7,11 ± 0,82	2,74 ± 1,77	
iso-Butters.	-0,36 ± 0,25	-2,56 ± 0,53		-0,37 ± 0,22	-2,39 ± 0,43		0,43 ± 0,1	-0,58 ± 0,76	
n-Butters.	21,39 ± 2,6	33,98 ± 2,62	***	0,60 ± 1,51	-0,70 ± 1,87		7,18 ± 1,6	12,21 ± 0,48	
iso-Valerians.	-0,74 ± 0,39	-3,53 ± 0,35		-0,58 ± 0,36	-3,05 ± 0,25		0,43 ± 0,13	-0,70 ± 1,21	
n-Valerians.	-0,32 ± 0,11	-3,68 ± 0,54		0,70 ± 0,22	-2,53 ± 0,58		1,62 ± 0,3	-0,19 ± 1,37	
n-Caprins.	0,60 ± 0,53	-1,86 ± 1,16		2,18 ± 0,23	-0,69 ± 0,77		1,46 ± 0,36	0,77 ± 0,98	
Summe	72,67 ± 8,13	25,91 ± 7,4	***	18,24 ± 8,05	-3,44 ± 1,96	***	41,04 ± 4,76	25,61 ± 5,76	***

3.2.2 Gallensäuren (GS)

Die in der Leber gebildeten primären GS (z.B. Cholsäure oder Chenodesoxycholsäure) werden durch die Mikrobiota des Darms zum Teil zu sekundäre GS (z.B. Deoxycholsäure oder Lithocholsäure) abgebaut. Daher können Erkenntnisse zu testsubstanzabhängigen Aktivitätsänderungen der Darmflora, im Gegensatz zu bakteriellen Fermentationsprodukten wie den SCFA oder Ammoniak, nur über quantitative Unterschiede primärer und sekundärer GS gewonnen werden.

Durch die Addition von 100ml intestinalen Extraktes (beinhaltet 0,6g Ochsen-galle) während der Dünndarmsimulation wurde der Gallensäuregehalt im System der NFM deutlich erhöht. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Gallensäurebestimmung für die FÜ(AFM) und FÜ(NFM) zusammenfassend dargestellt (Abb. 3-4).

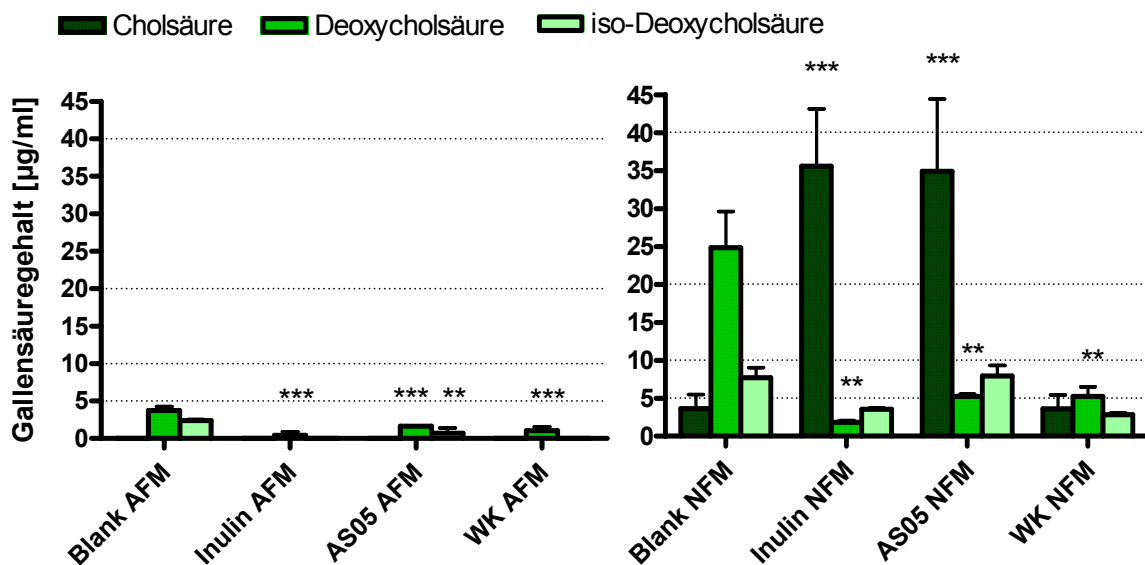


Abb. 3-4:

Gallensäuregehalt der FÜ AFM & FÜ NFM [in µg/ml]. Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen den FÜ Testsubstanzen und dem FÜ Blank der jeweiligen FM. Die Unterschiede wurden mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test berechnet.

(MW+SD, n=3) **p<0,01, ***p<0,001

In den FÜ(AFM) waren nur sehr geringe Mengen an Gallensäuren feststellbar. Der Cholsäuregehalt lag dabei in jeder der FÜ(AFM) unter der analytischen Nachweisgrenze. Die sekundäre GS Deoxycholsäure war im FÜ Blank(AFM), mit

einer Konzentration von 3,73 µg/ml, signifikant gegenüber den FÜ Testsubstanzen(AFM) erhöht. Ebenso die Iso-Deoxycholsäure, welche neben dem Blank allerdings nur im FÜ ASO5(AFM) mit einem minimalen Anteil von 0,7 µg/ml detektierbar war. Aufgrund der gastrointestinalen Simulation, mit der Addition eines mit Ochsen-galle und Enzymen angereicherten Verdauungsextraktes, konnten in den FÜ(NFM) deutlich größere Mengen an GS gegenüber der FÜ(AFM) festgestellt werden. Die Deoxycholsäure war im FÜ Blank(NFM) mit einer Konzentration von 24,8 µg/ml ebenfalls signifikant gegenüber den FÜ Testsubstanzen(NFM) erhöht. Im FÜ Inulin(NFM) und FÜ ASO5(NFM) konnten mit 35,53 µg/ml bzw. 34,87 µg/ml deutlich, signifikant erhöhte Cholsäuregehalte gegenüber dem FÜ Blank(NFM) festgestellt werden. Der FÜ WK(NFM) wies, mit einer Konzentration von 5,23 µg/ml im Falle der am stärksten vertretenen Deoxycholsäure, im Vergleich dazu sehr geringe Gallensäuregehalte nach Durchführung der NFM auf.

3.3 Ammoniakgehalt der Fermentationsüberstände

Die während des substratabhängigen Fermentationsprozesses resultierende Ammoniakproduktion stellt einen Marker für mikrobielle Veränderungen, hinsichtlich Wachstum und Aktivität, dar. Im Folgenden sind die Ergebnisse der chemisch-photometrischen Ammoniakquantifizierung jedes der gewonnenen Fermentationsüberstände als Mittelwert (n=3) dargestellt (Abb. 3-5).

Bei Betrachtung der Ergebnisse lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den nach „neuer“ und „alter“ Fermentationsmethode gewonnenen Fermentationsüberständen feststellen. Der Ammoniakgehalt der FÜ (NFM) war im Vergleich zu den FÜ (AFM) um einen ca. drei- (im Falle der WK: FÜ WK(AFM) = 26,99 mmol/l → FÜ WK(NFM) = 81,34 mmol/l) bis zehnfachen Wert (im Falle des Inulin: FÜ Inulin(AFM) = 4,12 mmol/l → FÜ Inulin(NFM) = 42,2 mmol/l) erhöht. Die einzelnen Testsubstanzen lassen im Ergebnis jedoch einen gemeinsamen Trend erkennen. So weisen die nach unterschiedlicher Methode gewonnenen FÜ gleichermaßen einen erhöhten Ammoniakgehalt der FÜ Blank und FÜ WK und einen im Vergleich dazu niedrigen Ammoniakgehalt der FÜ Inulin und FÜ ASO5 auf. Signifikante

Unterschiede zum FÜ Blank konnten im Falle der FÜ Inulin(NFM) und FÜ AS05(NFM) festgestellt werden.

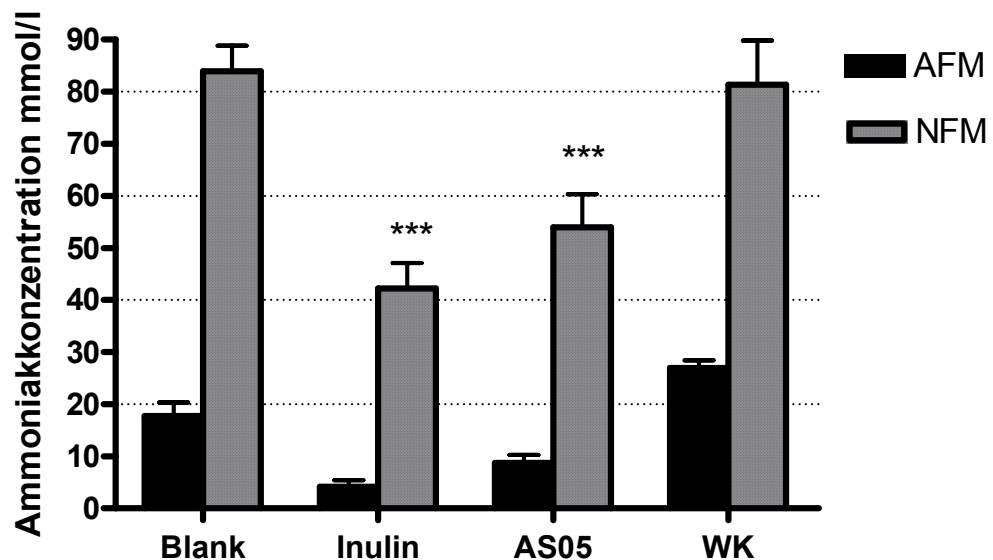


Abb. 3-5:

Vergleich der Ammoniakkonzentration [mM] der nach AFM und NFM gewonnenen FÜ. Dargestellt sind signifikante Unterschiede zwischen dem FÜ Blank und dem FÜ Testsubstanz der jeweiligen FM. Die Unterschiede wurden für jede Testsubstanz mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test berechnet. (MW+SD, n=3) ***p<0,001

3.4 Einfluss der Fermentationsüberstände auf die Proliferation und metabolische Aktivität kultivierter Kolonkarzinomzellen

3.4.1 Proliferation

Die Untersuchung der zeit- und dosisabhängigen Wirkung der Testsubstanzen auf das Wachstum der Kolonkrebszelllinie HT29 erfolgte mittels DAPI-Assay. Der DAPI-Assay wurde mit jedem Fermentationsüberstand (FÜ) der 3 unabhängigen Versuche 3fach durchgeführt. Beim Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Versuchstage (n=3) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Daher werden im Folgenden die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen für jede der *in vitro* fermentierten Testsubstanzen, im Vergleich beider Fermentationsmethoden (FM), im Mittel (n=9) dargestellt. Die auf einer Fluoreszenzmessung

basierende Quantifizierung der Zellzahl erfolgte 24, 48 und 72 h nach der Inkubation mit den Testsubstanzen in den Konzentrationen 2,5; 5; 10 und 20% (v/v) und wird relativ zur Mediumkontrolle (MK) angegeben. Als Positivkontrolle wurde Butyrat in den Konzentrationen 5 und 10 mM eingesetzt. Eine akute Zytotoxizität der FÜ [4 h Inkubation, siehe Pkt. 2.2.5], in den Konzentrationen bis 20% (v/v), wurde zuvor ausgeschlossen. Mit der Proliferationsuntersuchung lassen sich effektive Konzentrationen einer Testsubstanz wie der EC_{25} - und der EC_{50} -Wert bestimmen. Um die Ergebnisse der nach unterschiedlicher Methode gewonnenen FÜ gut und zugleich übersichtlich vergleichen zu können, erfolgt die graphische Darstellung für jede Testsubstanz einzeln.

3.4.1.1 Fermentation mit Inulin

Die Ergebnisse weisen eine stärkere Minimierung der Zellzahl durch die nach „neuem“ Fermentationsverfahren gewonnenen FÜ (FÜ (NFM)) im Vergleich zu den nach „altem“ Fermentationsverfahren gewonnenen FÜ (FÜ (AFM)) auf (Abb. 3-6; Tab. 3-3, S. 48). Der Blank beider FM im Vergleich zeigte dabei einen deutlicheren Unterschied im Ergebnis (nach 24 h ab einer Konzentration von 10% und nach 48 h in allen Konzentrationen signifikant) als die Testsubstanzen im Vergleich (nach 48 h in den Konzentrationen 5 und 10% sowie nach 72 h in den Konzentrationen 2,5; 5 und 10%). Auffällig ist jedoch, dass der nach dem „neuen“ Fermentationsverfahren gewonnene FÜ Inulin(NFM), im Gegensatz zur AFM, zu keiner signifikanten Minimierung der Zellzahl gegenüber dem FÜ Blank(NFM) geführt hat. Der FÜ Blank(NFM) senkte die Zellzahl bei einer Konzentration von 2,5% sogar signifikant stärker gegenüber dem FÜ Inulin(NFM). Der nach „altem“ Fermentationsverfahren gewonnene FÜ Inulin(AFM) zeigte bereits nach 24 h, ab einer Konzentration von 10%, eine signifikante Wachstumsinhibierung gegenüber dem Blank(AFM), was sich nach 48 h noch verdeutlichte. Nach 72 h wurde die Zellzahl durch alle FÜ(NFM) in den Konzentrationen 10 und 20% sowie durch den FÜ Inulin(AFM) auf annähernd 0% gegenüber der MK reduziert.

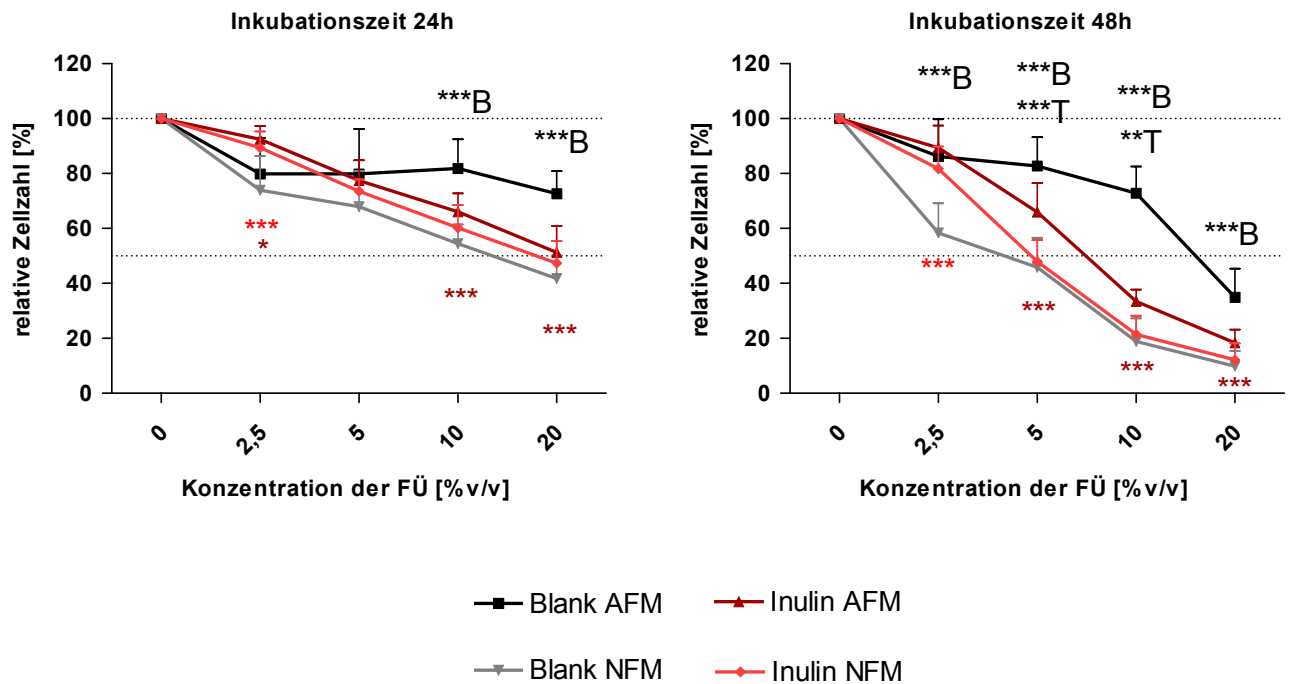
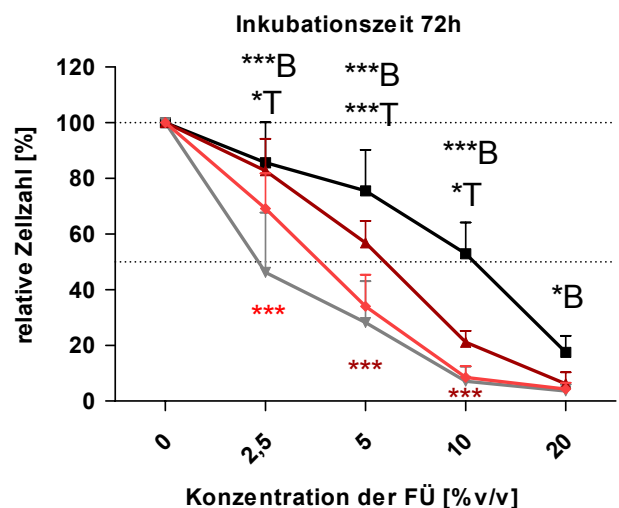


Abb. 3-6:
 Vergleich der Zellwachstumsmodulation von HT29-Zellen durch Inkubation mit FÜ der AFM und NFM nach 24, 48 und 72 h. Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen Blank und Testsubstanz innerhalb einer FM (in den Farben der Testsubstanz, unterhalb des Graphen dargestellt) sowie zwischen den FÜ Blank und FÜ Testsubstanz der beiden FM (in schwarz, oberhalb des Graphen dargestellt; Blank [B] / Testsubstanz [T])
 Unterschiede wurden für jede Konzentration mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test getrennt voneinander berechnet.
 (MW+SD, n=9) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001



3.4.1.2 Fermentation mit AS05

Die NFM mit der Testsubstanz AS05 zeigte bis zu einer Konzentration von 5% eine deutlichere Inhibition des HT29-Zellwachstums gegenüber der AFM (Abb. 3-7; Tab. 3-3, S. 48), wobei, im Gegensatz zu den FÜ Inulin, bereits nach 24 h signifikante Unterschiede zwischen den Testsubstanzen beider FM erkennbar waren.

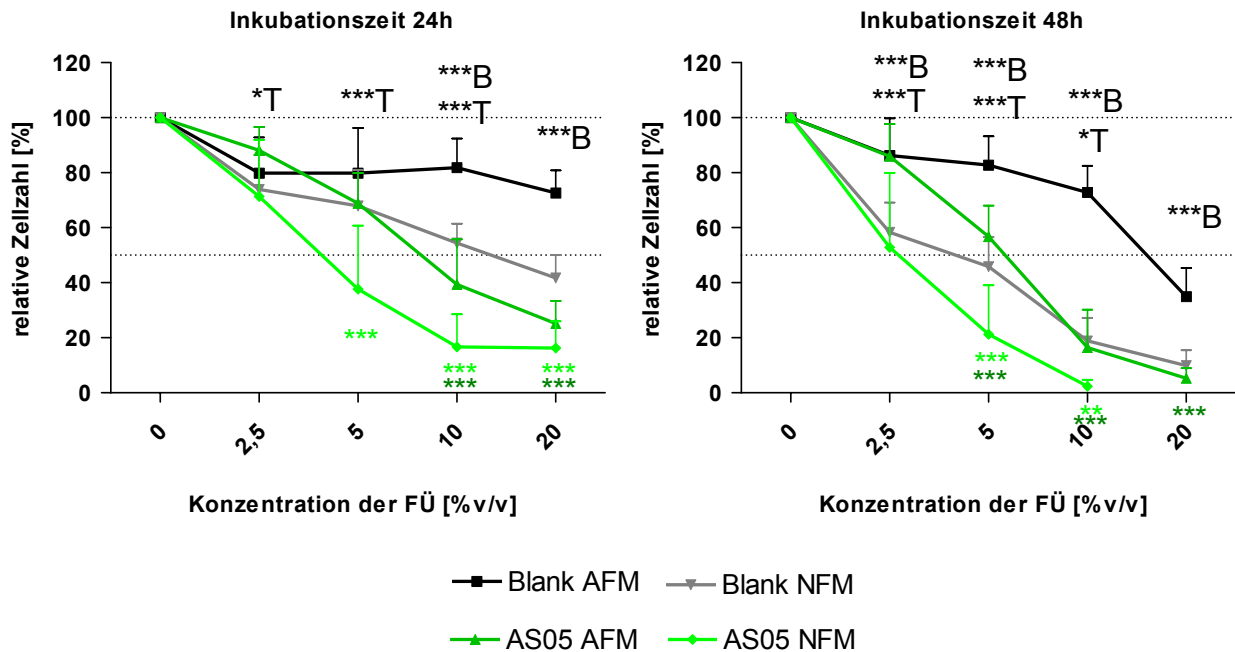
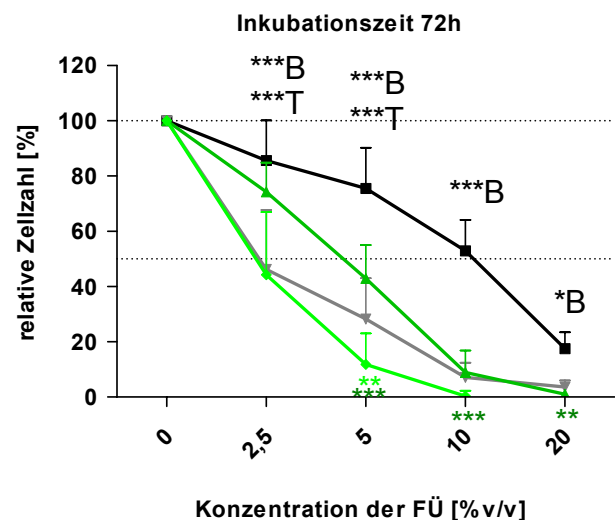


Abb. 3-7:
 Vergleich der Zellwachstumsmodulation von HT29-Zellen durch Inkubation mit FÜ der AFM und NFM nach 24, 48 und 72 h. Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen Blank und Testsubstanz innerhalb einer FM (in den Farben der Testsubstanz, unterhalb des Graphen dargestellt) sowie zwischen den FÜ Blank und FÜ Testsubstanz der beiden FM (in schwarz, oberhalb des Graphen dargestellt; Blank [B] / Testsubstanz [T])
 Unterschiede wurden für jede Konzentration mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test getrennt voneinander berechnet.
 (MW+SD, n=9) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001



Die Inkubation mit dem 20%igen FÜ AS05(NFM) führte bereits nach 48 h zu einer Senkung der relativen Zellzahl auf 0%. Desweiteren konnte, im Gegensatz zum FÜ Inulin(NFM), durch den FÜ AS05(NFM) auch eine signifikante Minimierung der Zellzahl gegenüber dem FÜ Blank(NFM), ab einer Konzentration von 5%, festgestellt werden, welche mit zunehmender Inkubationsdauer abnahm. Der FÜ AS05(AFM) zeigte nach 24 h, ab einer Konzentration von 10%, und nach 48 h, ab einer Konzentration von 5%, eine signifikante Wachstumsinhibierung der Tumorzellen gegenüber dem FÜ Blank(AFM).

3.4.1.3 Fermentation mit WK

Wie bei den Testsubstanzen zuvor, konnte die Tumorzellzahl durch die FÜ(NFM), bis zu einer Konzentration von 20%, deutlich stärker gesenkt werden im Vergleich zu den FÜ(AFM) (Abb. 3-8; Tab. 3-3, S.48).

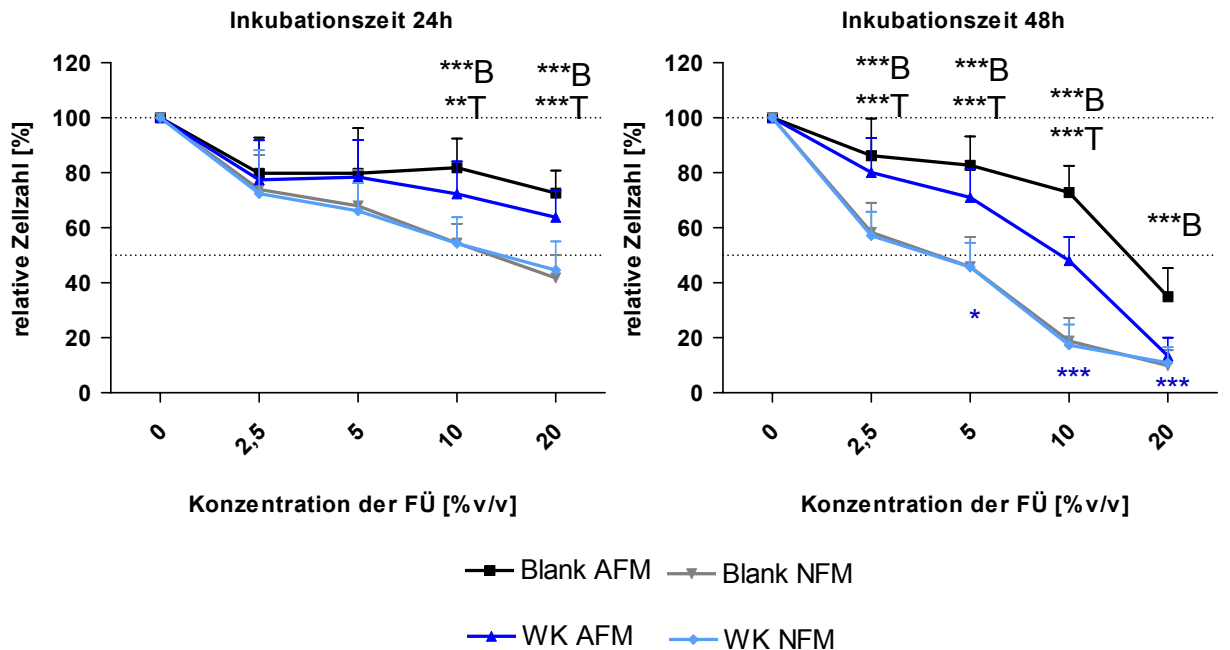


Abb. 3-8:
 Vergleich der Zellwachstumsmodulation von HT29-Zellen durch Inkubation mit FÜ der AFM und NFM nach 24, 48 und 72 h. Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen Blank und Testsubstanzen innerhalb einer FM (in den Farben der Testsubstanzen, unterhalb des Graphen dargestellt) sowie zwischen den FÜ Blank und FÜ Testsubstanzen der beiden FM (in schwarz, oberhalb des Graphen dargestellt; Blank [B] / Testsubstanzen [T])
 Unterschiede wurden für jede Konzentration mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test getrennt voneinander berechnet.
 (MW+SD, n=9) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Allerdings fällt auf, dass der FÜ WK(NFM) und der FÜ Blank(NFM) einen nahezu identischen Kurvenverlauf aufweisen und daher die Zellzahl gleichermaßen reduzierten. Im Gegensatz dazu zeigte der FÜ WK(AFM) nach 48 h, ab einer Konzentration von 5%, eine signifikante Wachstumsinhibierung gegenüber dem FÜ Blank(AFM).

Allgemein konnte in allen Fällen eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduzierung der HT29-Zellenanzahl nach der Inkubation mit den Testsubstanzen, gegenüber der Mediumkontrolle, festgestellt werden. Die Tabelle 3-3 fasst als effektive Konzentration für die Proliferationsergebnisse die EC_{50} -Werte [% (v/v)] jedes Fermentationsüberstandes (MW; n=9), zusammen. Die Bestimmung erfolgte mittels GraphPad Prism® nonlinear regression/one phase exponential decay.

Tabelle 3-3:

Übersicht der EC_{50} -Werte (% v/v; MW+SD, n=3) gewonnener Fermentationsüberstände (FÜ). Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen Blank und Testsubstanz innerhalb einer FM. Unterschiede wurden mittels one-way-ANOVA/Bonferroni post test berechnet. *p<0,05, *p<0,001**

	EC_{50} AFM				EC_{50} NFM			
	FÜ Blank	FÜ Inulin	FÜ AS05	FÜ WK	FÜ Blank	FÜ Inulin	FÜ AS05	FÜ WK
24 h	—	—	8,6 ± 2,7	—	11,2 ± 0,8	16,7 ± 1,4	3,8 [*] ± 0,6	11,8 ± 4,7
48 h	15,7 ± 1,6	7,6 [***] ± 1,2	5,6 [***] ± 0,7	9,3 [***] ± 0,7	3,8 ± 1,1	5,1 ± 1,03	2,4 ± 0,4	3,6 ± 0,8
72 h	10,7 ± 0,5	5,7 [***] ± 0,7	4,1 [***] ± 0,6	6,4 [***] ± 1,2	2,4 ± 1,02	3,5 ± 0,9	1,9 ± 0,4	2,2 ± 0,8

Die EC_{50} -Werte verdeutlichen die stärker wachstumsinhibierende Wirkung der nach dem „neuen“ Fermentationsverfahren gewonnenen FÜ gegenüber den HT29-Kolonkarzinomzellen. Bei den Ergebnissen der NFM fällt besonders die stark wachstumsinhibierende Wirkung des FÜ Blank im Vergleich zu den FÜ Testsubstanzen auf, welche nur in den FÜ AS05(NFM) nach 24h signifikant stärker ausgeprägt war.

Als Positivkontrolle wurde sowohl bei den Proliferationsuntersuchungen der FÜ (AFM) als auch der FÜ (NFM) (n=18) Butyrat in den Konzentrationen 5 & 10 mM eingesetzt. Dabei konnte eine Abnahme der HT29-Zellzahl bei steigender Butyratkonzentration festgestellt werden (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4:

Proliferationsergebnisse der Inkubation von HT29-Zellen mit Butyrat (Positivkontrolle) in den Konzentrationen 5 und 10mM (% rel. zur MK; MW+SD, n=18).

	24 h	48 h	72 h
5 mM	81,67 ± 10,39	55,16 ± 12,11	38,42 ± 9,93
10 mM	74,13 ± 11,47	39,47 ± 10,44	21,89 ± 9,38

3.4.1.4 Fermentationsmedien

Um den Einfluss der für die jeweilige Fermentationsanordnung verwendeten Fermentationsmedien auf das Wachstum der HT29-Zellen abschätzen zu können, wurde der DAPI-Assay in 3facher Wiederholung mit selbigen durchgeführt (Abb. 3-9). Das für die NFM verwendete Nährmedium nach Macfarlane et al. [2005] wurde einzeln und unbehandelt sowie nach simulierter Magen- und Dünndarmpassage, mit Addition des intestinalen Extraktes, getestet.

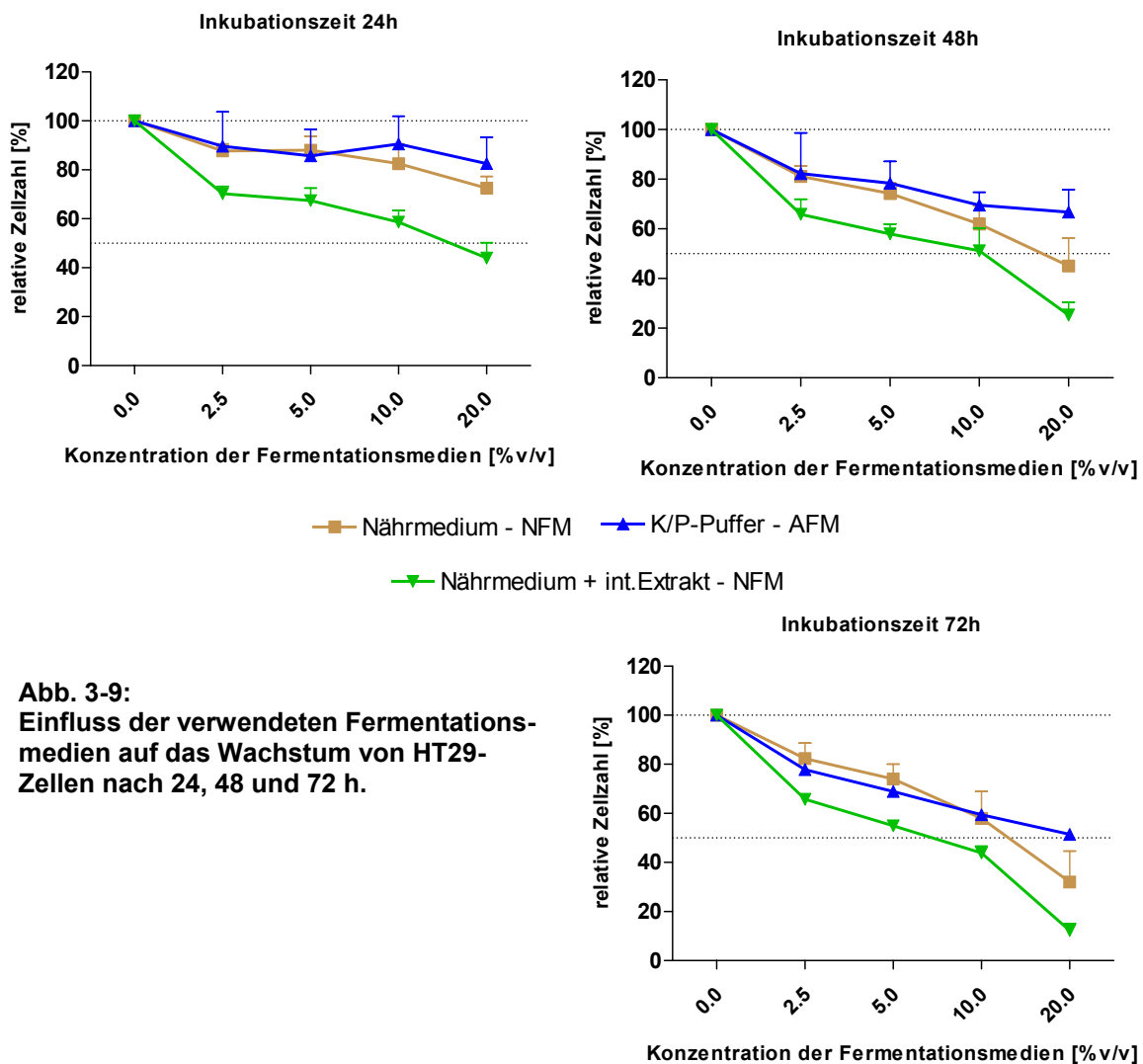


Abb. 3-9:

Einfluss der verwendeten Fermentationsmedien auf das Wachstum von HT29-Zellen nach 24, 48 und 72 h.

Die HT29-Zellzahl konnte, gegenüber der Mediumkontrolle, durch jede der verwendeten Fermentationsmedien in den Konzentrationen 2,5 bis 20% (v/v) reduziert werden. Das Nährmedium nach Macfarlane et al. [2005] mit Addition des intestinalen Extraktes wies dabei den stärksten wachstumsinhibierenden Effekt und der bei der AFM verwendete Kaliumphosphatpuffer, mit einer maximalen Reduktion der Zellzahl von 51,5% gegenüber der MK (20% v/v, 72 h Ink.), den schwächsten wachstumsinhibierenden Effekt auf (siehe Signifikanz, Tab. 3-5; EC₅₀-Werte, Tab. 3-6;). Das Nährmedium ohne eine Addition des intestinalen Extraktes zeigte einen dem Kaliumphosphatpuffer ähnlichen Kurvenverlauf mit einem stärker wachstumsinhibierenden Effekt bei einer Konzentration von 20% (sign. Unterschied zum K/P-Puffer nach 48 h, siehe Tab. 3-5).

Tabelle 3-5:

Signifikante Unterschiede zwischen der Zellwachstumsmodulation von HT29-Zellen durch die in den Versuchen verwendeter Fermentationsmedien (K/P = Kaliumphosphatpuffer, NM = Nährmedium, i.E. = intestinales Extrakt). Unterschiede wurden für jede Konzentration mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test getrennt voneinander berechnet. (MW+SD, n=9) *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001**

	24h			48h			72h		
	NM ⇒ K/P	NM + i.E. ⇒ NM	NM + i.E. ⇒ K/P	NM ⇒ K/P	NM + i.E. ⇒ NM.	NM + i.E. ⇒ K/P	NM ⇒ K/P	NM + i.E. ⇒ NM.	NM + i.E. ⇒ K/P
2,5%(v/v)	-	*	*	-	-	-	-	-	-
5%(v/v)	-	**	*	-	-	*	-	-	-
10%(v/v)	-	**	***	-	-	*	-	-	-
20%(v/v)	-	***	***	**	*	***	-	*	***

Tabelle 3-6:

Übersicht der EC₅₀-Werte der in den Versuchen verwendeten Fermentationsmedien

	EC ₅₀		
	NM	K/P-Puffer	NM + int. Ext.
24h	—	—	13,35
48h	15,85	—	7,15
72h	12,08	—	6,35

3.4.2 Metabolische Aktivität

Da sich die metabolische Aktivität eines zellulären Testsystems auf die Zellzahl im System bezieht, bietet sich der CTB-Assay in seiner Durchführung und Auswertung als eine mit dem DAPI-Assay kombinierte Zusatzoption an.

Im Folgenden sind die Ergebnisse des gleichzeitig durchgeführten DAPI- und CTB-Assay für jeden Fermentationsüberstand im Vergleich graphisch und prozentual dargestellt. Beim Vergleich der Fermentationsmethoden (AFM & NFM) konnte für jede Testsubstanz ein durchschnittlich um ca. 20-30% niedrigerer CTB-Wert (relativ zur MK) durch die nach „neuer“ Fermentationsmethode gewonnenen Fermentationsüberstände festgestellt werden [$\text{CTB-FÜ}(\text{AFM}) > \text{CTB-FÜ}(\text{NFM})$].

Bei der Betrachtung der Ergebnisse lässt sich im Falle des FÜ Blank(NFM) eine Abnahme der metabolischen Aktivität der HT29-Zellen im Zusammenhang mit einer abnehmenden Zellzahl erkennen (Abb. 3-10). Der FÜ Blank(AFM) stattdessen, führte erst nach 72h, ab einer Konzentration von 10% zu einer leichten Minimierung der metabolischen Aktivität gegenüber der Mediumkontrolle, trotz einer relativen Zellzahl von nur ca. 50% (10% FÜ) bzw. 20% (20% FÜ).

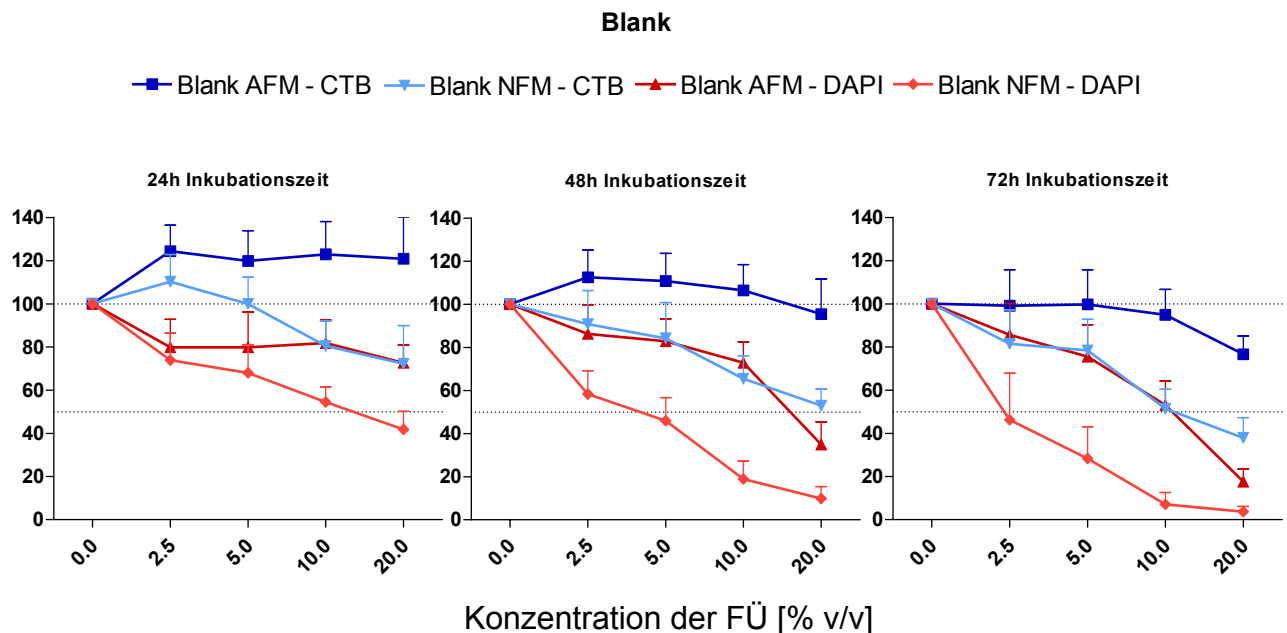


Abb. 3-10:

Vergleich des Proliferationsverhaltens und der metabolischen Aktivität von HT29-Zellen durch Inkubation mit dem FÜ Blank der AFM und NFM nach 24, 48 und 72 h. Darstellung der Ergebnisse relativ zur Mediumkontrolle (MW+SD, n=9).

Die Ergebnisse der Inkubation mit dem FÜ Inulin(NFM) waren sowohl bezüglich der Reduzierung der relativen Zellzahl als auch der Reduzierung der relativen metabolischen Aktivität vergleichbar mit denen des FÜ Blank(NFM). Der FÜ Inulin(AFM) führte neben einer Reduzierung der Zellzahl auch zu einer leichten Verringerung des Metabolismus der HT29-Zellen im Vergleich zu den Werten des FÜ Blank(AFM) (Abb. 3-11 & Abb. 3-10).

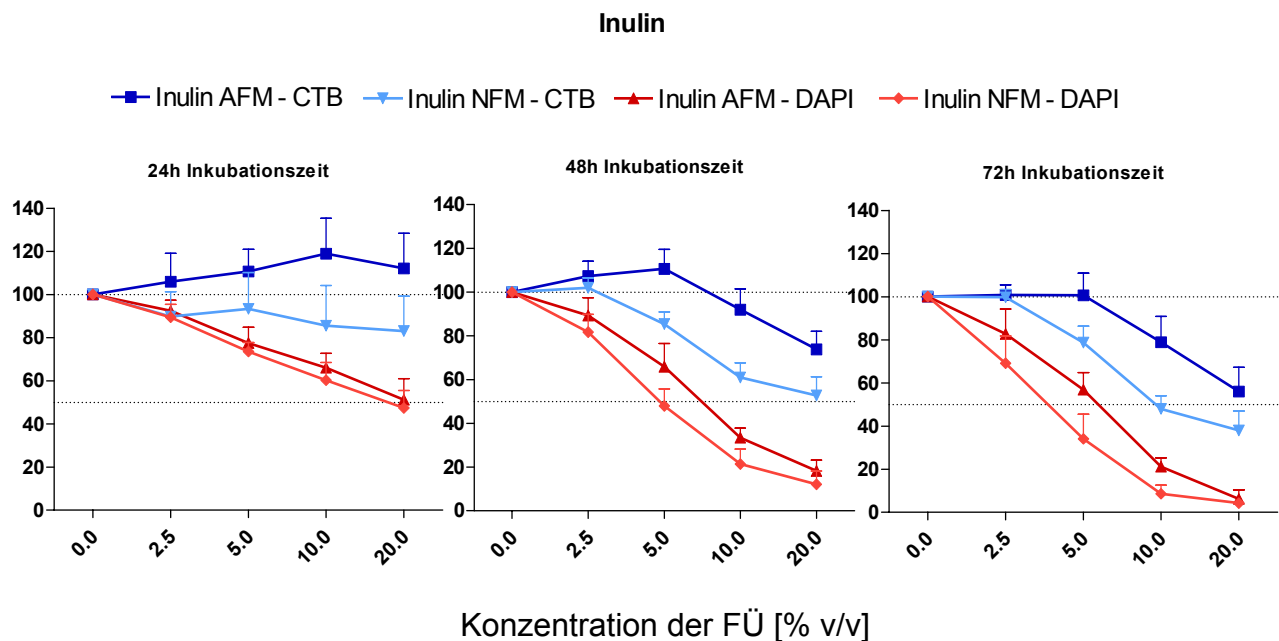
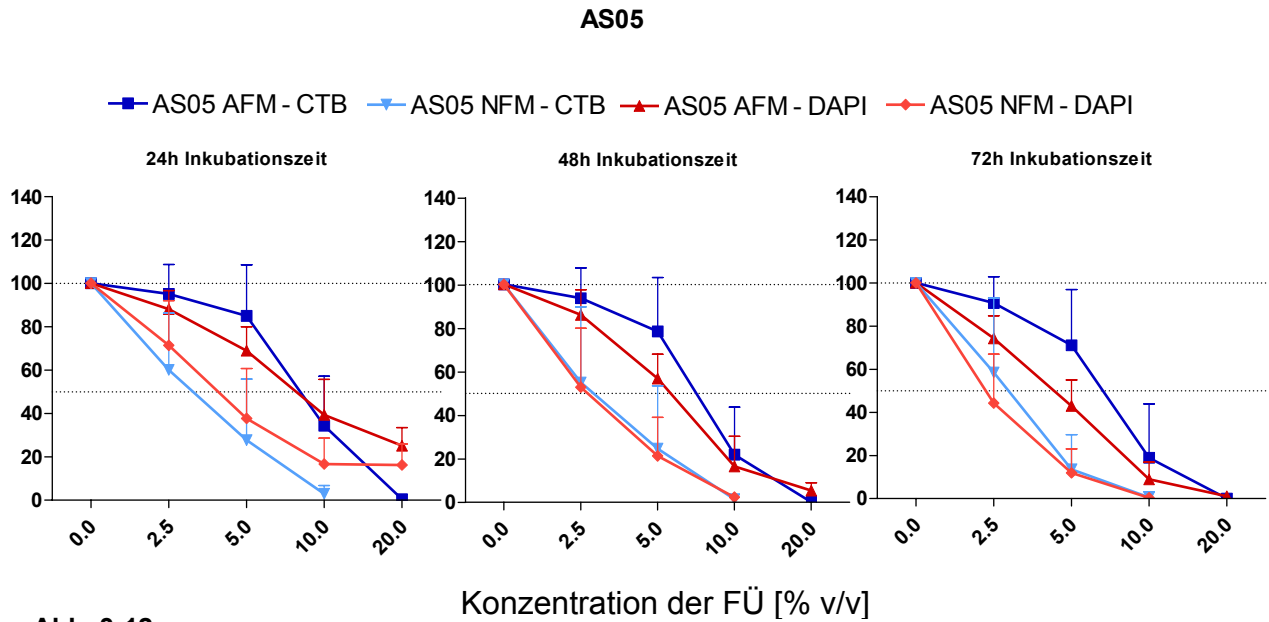


Abb. 3-11:

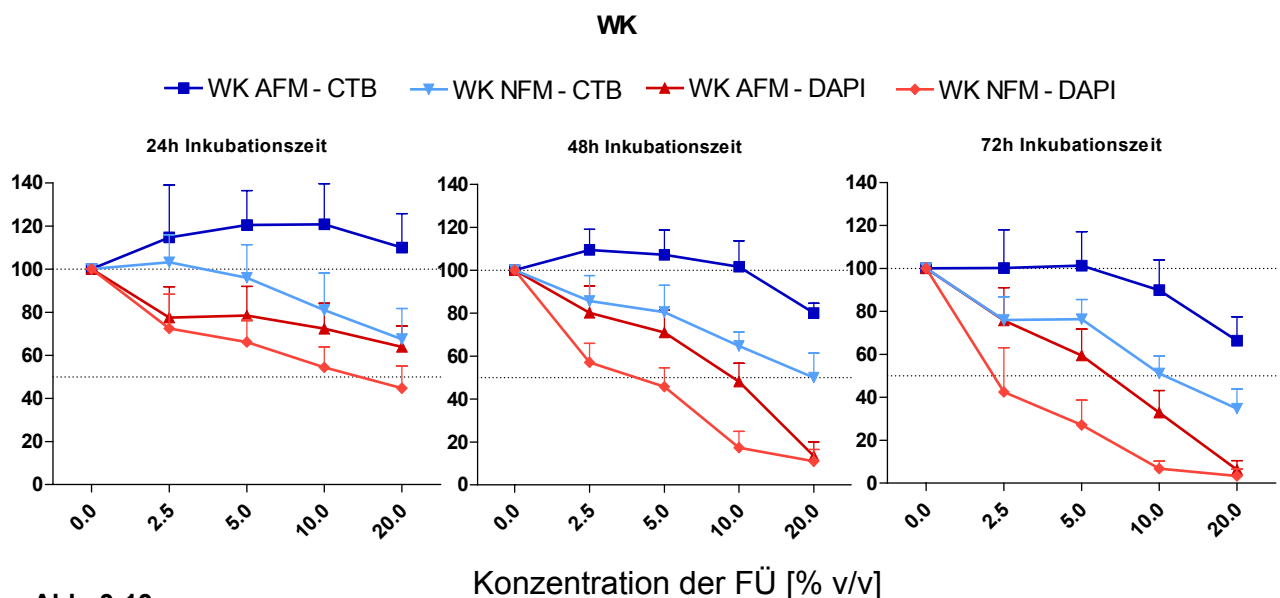
Vergleich des Proliferationsverhaltens und der metabolischen Aktivität von HT29-Zellen durch Inkubation mit dem FÜ Inulin der AFM und NFM nach 24, 48 und 72 h. Darstellung der Ergebnisse relativ zur Mediumkontrolle (MW+SD, n=9).

Bezogen auf die relative Zellzahl führte der FÜ AS05 (NFM & AFM) zur deutlichsten Einschränkung der metabolischen Aktivität der HT29-Zellen aller Testsubstanzen (Abb. 3-12). Bereits nach 24h konnte durch den FÜ AS05(NFM), ab einer Konzentration von 10% (rel. ZZ = 16,7%), und durch den FÜ AS05(AFM), ab einer Konzentration von 20% (rel. ZZ = 25,2%), der CTB-Wert auf 0% relativ zur Mediumkontrolle gesenkt werden.

**Abb. 3-12:**

Vergleich des Proliferationsverhaltens und der metabolischen Aktivität von HT29-Zellen durch Inkubation mit dem FÜ AS05 der AFM und NFM nach 24, 48 und 72 h. Darstellung der Ergebnisse relativ zur Mediumkontrolle (MW+SD, n=9).

Das Ergebnis der Inkubation mit den FÜ WK (AFM & NFM) ist mit dem der FÜ Blank (AFM & NFM) vergleichbar (Abb. 3-13 & Abb. 3-10). Ein additiver Effekt der FÜ WK hinsichtlich einer Reduzierung der metabolischen Aktivität von HT29-Zellen konnte daher nicht festgestellt werden.

**Abb. 3-13:**

Vergleich des Proliferationsverhaltens und der metabolischen Aktivität von HT29-Zellen durch Inkubation mit dem FÜ WK der AFM und NFM nach 24, 48 und 72 h. Darstellung der Ergebnisse relativ zur Mediumkontrolle (MW+SD, n=9).

Abschließend erfolgt die Angabe der metabolischen Aktivität als relativer Wert, welcher sich aus dem Bezug zwischen relativer metabolischer Aktivität und relativer Zellzahl ergibt.

Gleichung 3-1: Bestimmung der relativen metabolischen Aktivität

$\text{relative metabolische Aktivität} = \frac{\text{relativer CTB-Wert} \times 100}{\text{relativer DAPI-Wert}}$
--

Bei niedrigen relativen Zellzahlen (< 20%) nimmt auch die Genauigkeit der CTB-Messung ab, was beim rechnerischen Bezug auf den DAPI-Wert deutlich wird. Unterschiede bei der fluoreszenzphotometrischen Auswertung (CTB = Fluoreszenzmessung im Mediumüberstand; DAPI = punktuelle Fluoreszenzmessung am Mikrotiterplattenboden) können dabei als Grund genannt werden. Zusätzlich können im Mediumüberstand schwimmende vitale Zellen, welche bei Durchführung des DAPI-Assays verworfen werden, einer Erhöhung der metabolischen Aktivität beitragen. Ebenfalls wäre zu überlegen, ob wenige restlich verbleibende Zellen, nach der Auflösung größerer Zellverbände, eine Art „Überlebensreflex“ entwickeln und dadurch ihren Metabolismus steigern. Hierbei handelt es sich jedoch nur um eine Theorie und müsste erst bewiesen werden. Die relative metabolische Aktivität wird daher für die Testsubstanzkonzentrationen 2,5 und 5% (v/v), nach 24- und 48-stündiger Inkubation der HT29-Zellen dargestellt (Tabelle 3-7).

Wie zuvor in der graphischen Darstellung, lässt auch die Betrachtung der Ergebnisse der relativen metabolischen Aktivität einen Metabolismus-inhibierenden Effekt der FÜ AS05 im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen erkennen. Dabei führten die FÜ AS05(NFM) in den Konzentrationen 2,5 und 5 % (v/v) zu einer stärkeren Einschränkung des Metabolismus der HT29-Zellen als die FÜ AS05(AFM).

Tabelle 3-7:
relative metabolische Aktivität nach 24 & 48 h für die FÜ beider FM in den Konzentrationen 2,5 und 5 % (v/v) (MW+SD, n=9)

		CTB/DAPI – AFM				CTB/DAPI – NFM			
	% v/v	FÜ Blank	FÜ Inulin	FÜ AS05	FÜ WK	FÜ Blank	FÜ Inulin	FÜ AS05	FÜ WK
24 h	2,5	160,1	114,92	109,55	151,16	154,7	101,34	81,44	149,03
		± 34,85	± 15,15	± 23,64	± 32,4	± 38,08	± 18,24	± 22,89	± 39,69
	5	155,82	143,81	122,96	160,16	154,15	127,69	76,6	148,63
		± 36,72	± 16,48	± 31,71	± 46,32	± 45,77	± 25,92	± 23,08	± 36,06
48 h	2,5	133,92	121,22	111,24	140,28	158,47	126,07	95,22	152,87
		± 28,68	± 14,53	± 25,45	± 31,24	± 27,42	± 15,88	± 34,68	± 28,79
	5	136,25	171,09	120,12	153,74	188,89	181,78	78,24	179,48
		± 26,59	± 25,78	± 24,82	± 28,83	± 41,07	± 28,56	± 25,37	± 31,34

3.5 Induktion genotoxischer Schäden durch die Fermentations-überstände (Comet Assay)

Um das Ausmaß eines möglichen genotoxischen Potentials der FÜ abschätzen und im Vergleich beider Fermentationsmethoden darstellen zu können, wurde der Comet Assay mit den FÜ Blank und FÜ Inulin in den Konzentrationen 5 und 10 % durchgeführt. Die HT29-Zellen wurden 60 min mit den Testsubstanzen (FÜ – gepooled aus den 3 unabhängigen Versuchen) inkubiert (Abb. 3-14). Die Zellvitalität ist durch keine der Testsubstanzen (in den Konz. 5 & 10%), nach der 60minütigen Inkubation, signifikant gegenüber der Mediumkontrolle gesenkt worden (im Durchschnitt lag die Vitalität bei 94 – 96% nach 60min).

Die 60minütige Inkubation der HT29-Kolonkarzinomzellen mit den FÜ Blank (AFM & NFM) und FÜ Inulin (AFM & NFM) in den Konzentrationen 5 und 10% (v/v) führte zu einer maximalen Steigerung der Tail Intensity auf 7,2%, nach Behandlung mit dem FÜ Inulin(NFM) in der Konzentration 10% (v/v). Die Inkubation mit den FÜ in der Konzentration 10% (v/v) resultierte, außer im Falle des FÜ Inulin(AF), in einem signifikanten Anstieg der genotoxischen

Schadwirkung im Vergleich zu der Inkubation mit den FÜ in der Konzentration 5% (v/v). Die Behandlung mit den FÜ (NFM) ergab gegenüber den FÜ (AFM), außer nach der Inkubation mit dem FÜ Inulin in der Konzentration 5% (v/v), z.T. deutlich erhöhte Tail Intensity-Werte. Die Steigerung der genotoxischen Schadwirkung durch die Behandlung mit den FÜ (NFM) war im Falle des FÜ Blank in der Konzentration 5% (v/v) und im Falle des FÜ Inulin in der Konzentration 10% (v/v) signifikant. Beim Vergleich der FÜ Inulin und der FÜ Blank der jeweiligen FM konnten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Tail Intensity-Ergebnisses, v.a. durch Inkubation mit den FÜ(NFM), festgestellt werden. Nur die Inkubation mit dem FÜ Inulin(AF) ergab mit 4,4% einen signifikanten Anstieg der Tail Intensity gegenüber dem FÜ Blank(AF) mit 2,9%, in der Konzentration 5% (v/v). Allerdings lag nach Behandlung der Zellen mit den FÜ(AF) in der Konzentration 10% (v/v) der Tail Intensity-Wert des FÜ Inulin(AF), mit 4,6%, unter dem vom FÜ Blank(AF) erzielten Wert von 5,24%.

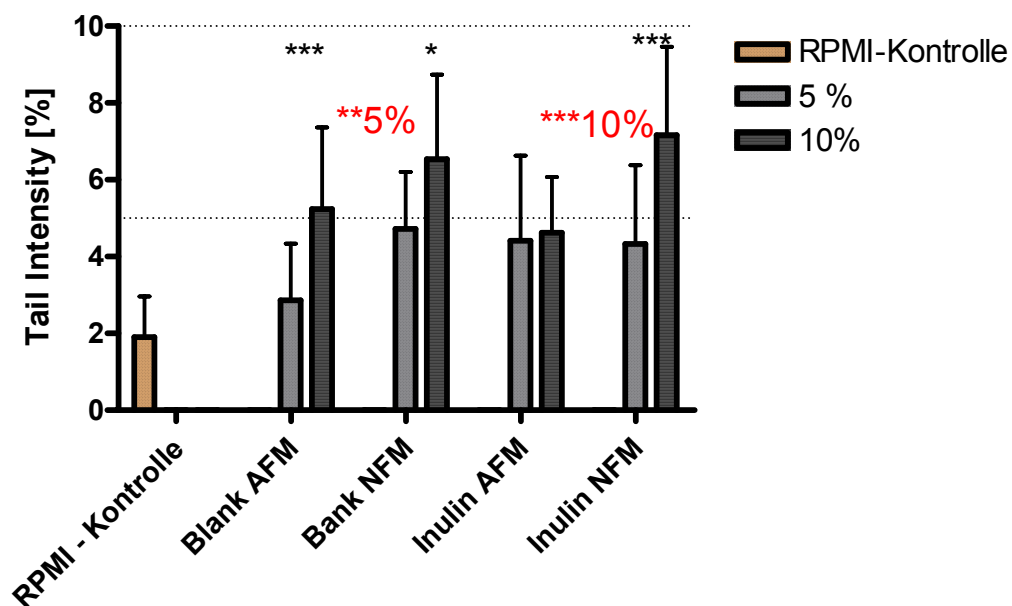


Abb. 3-14:

Vergleich der genotoxischen Schadwirkung der FÜ Blank (AFM & NFM) und FÜ Inulin (AFM & NFM) nach 60minütiger Inkubation der HT29-Zellen (MW+SD, n=4). Angegeben sind signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen 5 & 10% (v/v) einer Testsubstanz (in schwarz oberhalb der Testsubstanz dargestellt) sowie signifikante Unterschiede zwischen den Fermentationsmethoden einer Testsubstanz (in rot und mit Angabe der entsprechenden Konzentration zwischen den FM dargestellt). Die Unterschiede wurden mittels two-way-ANOVA/Bonferroni post test berechnet. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4 Diskussion

Die mit einer geringen Aufnahme an Obst & Gemüse sowie mit einer erhöhten Aufnahme von Fleisch & Fett verbundene und vorwiegend in den westlichen Industrieländern verbreitete, sogenannte „western-style diet“, wird bei einem dauerhaften Verzehr mit der Entwicklung kolorektaler Tumore in Verbindung gebracht [Berlau et al., 2004; Sachse et al., 2002]. Neben einer Vermeidung der Aufnahme potentieller Schadstoffe sollte sich eine gesunde Ernährung, mit dem Ziel eines reduzierten toxischen Potentials des Darminhalts, günstig auf die Mikroflora des Darms auswirken. Die Bildung genotoxischer Potentiale wird, im Zusammenhang mit einer langen Transitzeit des Faeces im Dickdarm, maßgeblich durch die Wechselwirkungen zwischen Faecesmatrix und Darmflora beeinflusst. Im Zuge der bakteriellen Fermentation bestimmter Nahrungsbestandteile variieren Wachstum und metabolische Aktivität der Mikroflora im Darm, wodurch z.B. über die Bildung von Metaboliten, die Konversion von Schadstoffen oder die Beeinflussung immunologischer Faktoren sowohl positive als auch negative Effekte erzielt werden können [O'Hara & Shanahan, 2006; Sanders, 1999]. So kommt der für den oberen Verdauungstrakt des Menschen unverdaulichen Substanzklasse der Ballaststoffe eine besondere Bedeutung bei der Erzielung krebspräventiver Effekte im Dickdarm zu.

Mit der *in vitro* Fermentationssimulation lassen sich Einflüsse bestimmter Nahrungsmittelinhaltsstoffe, wie den Ballaststoffen, auf das Wachstum und die Aktivität der Darmflora (z.B. Bildung von Metaboliten) und in dessen Folge auf die Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms beobachten und analysieren. Um dabei die *in vitro* Bedingungen möglichst an die physiologischen *in vivo* Bedingungen anzupassen, erscheint eine Simulation des gesamten GIT als sinnvoll. Basierend auf diesem Gedanken, sollte die one-batch-*in vitro*-Fermentation nach Barry et al. [1995] in der vorliegenden Arbeit durch eine vorherige Simulation der Prozesse des oberen Verdauungstraktes modifiziert werden. Um daraus resultierende Effekte besser erkennen zu können, erfolgte eine parallele Durchführung beider Fermentationsverfahren (mit und ohne Simulation des oberen Verdauungstraktes). Die gewonnenen FÜ wurden anschließend chemisch und biologisch charakterisiert. Dazu erfolgte die Bestimmung des pH-Wertes, die Analyse

gebildeter Fermentationsprodukte bzw. –metabolite (SCFA, GS, Ammoniak) und die Untersuchung von Effekten gegenüber kultivierter Dickdarmkrebszellen, hinsichtlich der Modulation von Wachstum und Metabolismus sowie hinsichtlich der Induktion genotoxischer Schäden.

Beim Vergleich der Ergebnisse konnten zum Teil große Unterschiede zwischen den nach unterschiedlicher Methode gewonnenen FÜ, in Bezug auf Zusammensetzung und zellbiologische Wirkung gegenüber transformierter Kolonzellen, festgestellt werden. Neben der unterschiedlichen Versuchsanordnung scheinen vor allem die verwendeten Fermentationsmedien die Resultate maßgeblich beeinflusst zu haben.

4.1 Veränderung des pH-Wertes durch die Fermentation

Die direkt im Anschluss an die 24stündige Fermentation durchgeführte pH-Wert-Messung der Fermentationssuspension bietet die erste Möglichkeit der Charakterisierung fermentativer Prozesse. Die Bildung kurzkettiger, schwacher Säuren ($pK_a \sim 4,8$), als Konsequenz einer Verstoffwechslung der für den oberen Verdauungstrakt des Menschen unverdaulichen Nicht-Stärke-Polysaccharid-(NSP) bzw. Ballaststoff-Fraktionen, durch die Mikroflora des Darms, steht in engem Zusammenhang mit einer Senkung des pH-Wertes im Dickdarm [Topping & Clifton, 2001]. Alle FÜ der Testsubstanzen wiesen sowohl nach der AFM als auch nach der NFM einen signifikanten Abfall des pH-Wertes gegenüber der Kontrolle auf, wodurch auf einen bakteriellen Abbau der Ballaststoff-Fraktionen geschlossen werden kann (Tabelle 3-1). Die Fermentation mit Inulin (AFM: 5,17 / NFM: 4,91) führte zur stärksten pH-Wert-Senkung gegenüber dem Blank (AFM: 6,47 / NFM: 5,94), gefolgt vom Apfelextrakt (AFM: 5,62 / NFM: 5,33) und der Weizenkleie (AFM: 5,97 / NFM: 5,53). Dieses Ergebnis lässt eine verstärkte bakterielle Verstoffwechslung des Inulin gegenüber den anderen Testsubstanzen vermuten. Dem Milieu des Übergangs vom terminalen Ileum zum Caecum entsprechend [Meddah et al., 2001; Molly et al., 1993], erfolgte nach Abschluss der nach der NFM durchgeführten Dünndarmsimulation mit der Addition der Faecessuspension eine Justierung des pH-Wertes auf 6,5. Die Verwendung des

neutralen K/P-Puffers bei der AFM führte nach Lösung der Testsubstanzen und Addition der Faecessuspension zu pH-Werten zwischen 6,6 & 6,8 vor dem Start der Fermentation. Die nach Beendigung der NFM ermittelten, im Vergleich zur AFM um ca. 0,25 – 0,5 niedrigeren pH-Werte können daher einerseits mit der vorherigen pH-Wert-Differenz und andererseits mit einer möglichen zusätzlichen bakteriellen Fermentation der in dem Fermentationsmedium enthaltenen Protein- & Kohlehydrat-Bestandteile bzw. deren Spaltprodukte begründet werden.

4.2 Bildung von Fermentationsprodukten & Metaboliten

4.2.1 kurzkettige Fettsäuren (SCFA)

Die SCFA-Bildung gilt als ein Marker des bakteriellen Abbaus unverdaulicher NSP bzw. Ballaststoffe [Topping & Clifton, 2001]. Im Darmlumen des Menschen treten SCFA in physiologischen Konzentrationen von 60 bis 130mM auf [Mortensen & Clausen 1996]. Die nach Durchführung der „neuen“ Fermentationsmethode gewonnenen FÜ wiesen dabei in etwa die doppelte Konzentration an SCFA im Vergleich zu den nach „alter“ Fermentation gewonnenen FÜ auf (Abb. 3-1 bis 3-3). Aufgrund der guten Resorbierbarkeit der SCFA im Dickdarm (Resorptionsraten von bis zu 95%) [Topping & Clifton, 2001], mit dem Resultat sinkender SCFA-Konzentrationen in distalen Bereichen des Kolons [Macfarlane & Gibson, 1998a], kann von einem zuvor minimalen SCFA-Gehalt der Faecesproben, welche für die parallele Durchführung der FM zu jeweils gleichen Anteilen verwendet wurden, ausgegangen werden. Die hohen SCFA-Gehalte der FÜ(NFM) lassen daher auf eine im Vergleich zur AFM gesteigerte Aktivität der Mikroflora und/oder auf ein vermehrtes Angebot an fermentierbaren Substrat schließen. Der FÜ Blank(NFM) wies in Relation zu den FÜ Testsubstanzen(NFM) deutlich größere SCFA-Gehalte auf als der FÜ Blank(AFM) (Abb. 3-1 bis 3-3), was vor allem nach Abzug der Blank-Werte von den Testsubstanzen (Tab. 3-2) deutlich wurde und auf eine zusätzliche Fermentation des bei der NFM verwendeten Nährmediums bzw. dessen Komponenten (siehe Anhang Seite 88) schließen lässt. Neben dem geringen Pektin- und Stärkeanteil könnten dabei vor allem die in der Mikrobiologie als Wachstumsstimulans in Nährböden und Nährmedien eingesetzten,

proteinogenen Bestandteile Trypton, Pepton und Hefeextrakt (Peptid-Hydrolyseprodukte), im Zuge einer Verstoffwechslung durch die Mikroflora, zu einer vermehrten SCFA-Produktion beigetragen haben. Macfarlane et al. [2005] konnten auch eine Verstoffwechslung des von den Mucuszellen der Darmwand synthetisierten und ebenfalls als Bestandteil im Nährmedium eingesetzten Glykoproteins Mucin durch bestimmte Bakterienpopulationen zeigen. Zusätzlich könnte die bakterielle Verstoffwechslung der Komponenten des Nährmediums durch eine Konformationsänderung während der bei pH=2 durchgeführten Magensimulation und/oder durch eine Bildung niedermolekularer, enzymatischer Hydrolyseprodukte während der Dünndarmsimulation begünstigt worden sein. Da die faecale Flora bei der AFM in einem anorganischen Kaliumphosphatpuffer gelöst und daher eher unter Substrat- bzw. Energiemangelbedingungen vorlag, führte die Addition der Testsubstanzen zu einer größtenteils deutlicheren Steigerung der SCFA-Produktion im Vergleich zur Kontrolle, als bei der Durchführung der NFM (Tab. 3-2). Besonders auffällig waren dabei die FÜ Inulin. Während der FÜ Inulin(AFM) gegenüber dem Blank eine um 46,11 mmol/l erhöhte Acetatkonzentration aufwies, konnte die Fermentation des Inulin nach der NFM die Acetatproduktion nur um 6,27 mmol/l gegenüber dem Blank steigern. Im Gegensatz dazu war die n-Butyrat-Konzentration im FÜ Inulin(NFM) signifikant gegenüber dem FÜ Inulin(AFM), nach Abzug der Blank-Werte, erhöht. Dies bekräftigt die Theorie, dass das bei der NFM eingesetzte Nährmedium, als verstoffwechselbares Substrat, zu Veränderungen in der Zusammensetzung der faecalen Flora geführt hat, wodurch z.B. das Wachstum solcher Bakterien begünstigt wurde, welche aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität vermehrt Butyrat und weniger Acetat in Gegenwart von Inulin gebildet haben.

Trotz dieser methodenabhängigen Unterschiede zwischen den FÜ lässt sich bei Betrachtung der Gesamtkonzentrationen gebildeter SCFA (Tab. 4-1) eine gemeinsame Tendenz erkennen. Die mit einer vermehrten Produktion von SCFA in Verbindung gebrachte, stark präbiotische Wirkung des Inulin [Van de Wiele et al, 2004 & 2007] und der Weizenkleie, mit ihren Arabinoxylan-Anteilen [Glei et al., 2006; Reddy et al, 2000], konnte sowohl nach Durchführung der AFM als auch der NFM festgestellt werden. Die Fermentation des Apfelpolyphenol-Extraktes AS05 führte nach beiden Methoden zur geringsten SCFA-Bildung, wobei der FÜ

Blank(NFM) den FÜ AS05(NFM) in seiner Gesamt-SCFA-Konzentration sogar noch übertraf. Dieser Effekt ist auf den im Vergleich zum Inulin und WK niedrigen Kohlehydrat- und NSP-Anteil des AS05 zurückzuführen (siehe Anhang ab Seite 89). Bei Betrachtung der Acetat:Propionat:n-Butyrat Verhältnisse fällt ein allgemein geringer Acetatanteil nach Durchführung der NFM auf. Dieses Ergebnis kann mit der bereits diskutierten Änderung des Wachstums bestimmter Bakterienarten durch die Verstoffwechslung hauptsächlich proteinogener Bestandteile des Nährmediums in Verbindung gebracht werden. Die verhältnismäßigen Anteile der mit einer krebspräventiven Wirkung in Verbindung gebrachten SCFA Butyrat und Propionat [Jan et al., 2002; Kobayashi et al., 2003] waren tendenziell, sowohl nach Durchführung der AFM als auch der NFM, in den FÜ Inulin und FÜ WK im Vergleich zum FÜ AS05 erhöht, was erneut eine positiv präbiotische Wirkung dieser beiden Testsubstanzen in Bezug auf die Produktion von SCFA bestätigt.

4.2.2 Gallensäuren (GS)

GS ermöglichen aufgrund ihrer emulgierenden Wirkung eine Verdauung fettlöslicher Nahrungsbestandteile im Dünndarm (enzymatischer Aufschluss + Resorption). Bis zu 98% der mit der Galle aus der Leber in das Duodenum sezernierten GS werden im Darm rückresorbiert (> 50% im terminalen Ileum) und über die Pfortader zur Leber transportiert (Enterohepatischer Kreislauf), wodurch nur ein geringer Anteil mit dem Faeces ausgeschieden wird (täglich ca. 0,3-0,6g). Die Ausscheidung ist dabei auch vom Löslichkeitsverhalten der GS (bestimmt durch deren Struktur und dem umgebenden pH-Milieu) sowie von dem Anteil GS-bindender Ballaststoffe im Darm abhängig [De Kok & van Maanen, 2000; Watzl & Leitzmann, 1999]. Im Darmlumen werden primäre GS (z.B. Cholsäure - CA) durch bakterielle Dekonjugation und Dehydroxylierung teilweise zu sekundären GS (z.B. Deoxycholsäure - DCA) umgewandelt, wodurch deren Lipidlöslichkeit erhöht und die Resorption durch passive Diffusion erleichtert wird [Biesalski & Grimm, 2002]. Über das Verhältnis von primären und sekundären GS können daher testsubstanzspezifische Veränderungen des Darmmilieus bzw. der Darmflora während des Fermentationsprozesses abgeleitet werden. Aufgrund der geringen

faecalen Ausscheidung [Keller&Jahreis, 2004] kann, wie zuvor im Falle der SCFA, von einem geringen Gallensäuregehalt der verwendeten Faecesproben ausgegangen werden. Jedoch unterscheiden sich die Ergebnisse, aufgrund der Addition von Ochsen-galle (Zusammensetzung siehe Anhang Seite 88) während der Dünndarmsimulation der NFM, maßgeblich. Die FÜ der AFM wiesen, der geringen Zufuhr über die Faecesproben entsprechend, nur minimale, z.T. unterhalb der analytischen Nachweisgrenze liegende Gallensäuregehalte auf (Abb. 3-4). Die sekundäre DCA war im FÜ Blank(AFM) signifikant gegenüber den FÜ Testsubstanzen erhöht.

In verschiedenen Versuchen konnten zytotoxische Effekte von GS nachgewiesen werden, wobei als Ursache eine Beeinflussung der Membranintegrität vermutet wird [De Boever et al, 2000b; Milovic et al., 2002]. Den sekundären GS konnten, in Abhängigkeit von der Konzentration, zusätzlich tumorpromovierende Eigenschaften nachgewiesen werden [Chaplin, 1998; Ferguson et al., 2001]. So wird v.a. die Steroidhormon-ähnliche DCA, durch eine konzentrationsabhängige (bis ca. 20µM) Beeinflussung der Protein Kinase C-Aktivität, mit einem kanzerogenen Potential in Verbindung gebracht [Milovic et al., 2002]. Eine fettreiche Ernährung gilt daher auch im Zusammenhang mit einer vermehrten Ausschüttung von Gallensäuren als Risikofaktor für die Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms [Hill, 1995; Hofmann, 2007]. Im Gegensatz zur AFM konnten bei der NFM durch die Addition der Ochsen-galle deutliche testsubstan-zabhängige Unterschiede festgestellt werden. Durch die Fermentation mit Inulin und AS05 wurden die Cholsäureanteile der Ochsen-galle in nur sehr geringem Maße durch die Darmflora zu den sekundären Gallensäuren DCA und iso-DCA umgewandelt. Im Gegensatz dazu bewirkte die Abwesenheit dieser beiden Testsubstanzen in der Kontrolle eine fast vollständige Konversion der Cholsäure zur DCA und iso-DCA (vergleichbarer Trend bei der AFM). Diese Ergebnisse stehen in engem Zusammenhang mit den im Vergleich zum FÜ Blank(NFM) niedrigen pH-Werten der FÜ Inulin & AS05(NFM). Neben der Beeinflussung der Löslichkeit und Konformation von Gallensäuren wirkt sich ein verminderter pH-Wert auf die Senkung der Aktivität des Enzyms 7-α-Dehydroxylase aus. Dieses Enzym ist an der Umwandlung der primären zu den sekundären Gallensäuren beteiligt [Watzl & Leitzmann, 1999]. De Boever et al.

[2000b] konnten in diesem Zusammenhang einen protektiven Effekt des Gallensalz-Hydrolase aktiven *Lactobazillus reuteri* im SHIME-Fermentationsmodell, durch Inkubation mit unterschiedlichen Mengen Gallensäuren (ca. 6 bis 10fache der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Menge), nachweisen. In dieser Studie wird von einer Bindung primärer Gallensäuren durch *L. reuteri* ausgegangen, wodurch eine Dekonjugation zu sekundären Gallensäuren vermieden wird. Ausgehend von dieser Theorie könnte die bei der Fermentation von Inulin und AS05, im Vergleich zum Blank, resultierende saure Milieubildung auch über eine Steigerung des Wachstums und der Aktivität acidophiler Bakterienkulturen, wie *L. reuteri*, zu einer Reduktion der Bildung potentiell genotoxischer DCA und iso-DCA beigetragen haben.

Der FÜ WK(NFM) wies einen nur sehr geringen Anteil sowohl primärer als auch sekundärer GS auf. Aufgrund der guten Bindung der GS durch Faseranteile von vor allem unlöslichen Ballaststoffen, wie z.B. Cellulose oder Lignin [Harris & Ferguson, 1999], könnten die Zentrifugationsschritte zur Gewinnung der FÜ, im Falle der WK (hoher Arabinoxylangehalt - siehe Anhang S. 86; [Ferguson & Harris, 1999b]), zu einem Verlust von Gallensäuren geführt haben. Ausgehend von einem konzentrationsabhängigen zyto- und genotoxischen Potential der Gallensäuren [Milovic et al., 2002] würde dadurch ein erhöhter Faseranteil im Dickdarm die Krebsprävention fördern.

4.2.3 Ammoniak

Als Abbauprodukt der Aminosäuren entsteht Ammoniak im Darmlumen v.a. durch die bakterielle Fermentation proteinogener Bestandteile, wie unverdautes Nahrungsprotein, endogenes Protein aus intestinalen und bakteriellen Sekreten, Mucin oder abgeschilferten Epithelzellen. Nukleinsäuren und Harnstoff können als nicht-proteinogene Stickstoffquellen im Darm genannt werden [Macfarlane et al., 1986; Wrong et al., 1985]. Durch eine Störung des Tricarbonsäurezyklus im Zusammenhang mit einer gesteigerten anaeroben Glykolyse hemmt Ammoniak die Zellatmung und fördert die Zellschädigung. Diesen Effekt konnte Darcy-Vrillon et al. [1996] an isolierten primären Kolonozyten zeigen. Die Kolonozyten wiesen in Gegenwart von Ammoniak einen Rückgang der Tricarbonsäurezyklus-abhängigen

Verstoffwechslung von Butyrat und im Gegensatz dazu einen erhöhten Umsatz der Glukose, als Ausgangssubstrat der Glykolyse, auf. Trotz dieser Wirkung als potentiell Zellgift treten im Darmlumen des Menschen Ammoniakkonzentrationen von bis zu 70mM auf [Macfarlane et al., 1986]. Die ammoniakproduzierenden, vorwiegend basophilen Keime weisen dabei eine gegenüber säurebildenden, acidophilen Keimen antagonistische Wirkung in Bezug auf Wachstum und Aktivität auf [Sanders, 1999]. Im sauren Milieu sinkt auch die zelluläre Resorption, da Ammoniak nur in der nicht-ionisierten Form durch die Zellen aufgenommen werden kann [Ichikawa & Sakata, 1998].

Die FÜ(NFM) wiesen 3-10fach erhöhte Ammoniakkonzentrationen gegenüber den FÜ(AFM) auf (Abb. 3-5). Diese Steigerung kann, wie im Falle der SCFA-Konzentrationen, als Resultat einer zusätzlichen Fermentation v.a. proteinogener Komponenten des Nährmediums betrachtet werden. Die FÜ Blank & FÜ WK wiesen, sowohl nach Durchführung der AFM als auch der NFM, erhöhte Ammoniakkonzentrationen im Vergleich zu den FÜ Inulin & FÜ AS05 auf. Eine Inhibierung des Wachstums und der Aktivität ammoniakproduzierender Keime im Zusammenhang mit einer, im Vergleich zum FÜ Blank und FÜ WK, gesteigerten sauren Milieubildung, erscheint dabei als sehr wahrscheinlich. Der in Relation zum pH-Wert wiederum deutlich erhöhte Ammoniakgehalt der FÜ WK lässt sich auf einen Proteingehalt der WK von 17,7% zurückführen (siehe Anhang Seite 86).

Bei Betrachtung aller Fermentationsprodukte bzw. –metabolite der FÜ im Vergleich (Tabelle 4-1) lassen sich Einflüsse hinsichtlich der pH-Wert-Bildung im Darm ableiten.

So scheint die geringe pH-Wert-Differenz der FÜ(AFM) und FÜ(NFM) (bereits vor Beginn der 24stündigen Fermentation Differenz von ca. 0,1 – 0,3), trotz des 2-3fach erhöhten SCFA-Gehaltes der FÜ(NFM), durch den gleichzeitig erhöhten Ammoniakgehalt der FÜ(NFM), basierend auf einer Verstoffwechslung proteinogener Bestandteile des Nährmediums, abgepuffert geworden zu sein. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Komponenten des Nährmediums (siehe Anhang Seite 88) selbst eine gewisse pH-Wert-puffernde Wirkung entfalten. Die Wechselwirkung zwischen den SCFA und Ammoniak, in Bezug auf den resultierenden pH-Wert, ist besonders am Beispiel der FÜ WK

erkennbar. Der relativ saure pH-Wert der FÜ AS05 scheint, aufgrund der im Vergleich zum Inulin und WK niedrigen SCFA-Konzentration, mit dem Phenolsäureanteil des Extrakts (v.a. Chlorogensäure, siehe Anhang Seite 89) in Zusammenhang zu stehen.

Tabelle 4-1:

Zusammenfassung der pH-Werte, sowie der detektierten Fermentationsprodukte bzw – metabolite aller FÜ (MW, n=3, Angabe der Gesamtkonzentration). FÜ nach abnehmenden pH-Werten sortiert.

	FÜ Blank-AFM	FÜ WK-AFM	FÜ AS05-AFM	FÜ Inulin-AFM	FÜ Blank-NFM	FÜ WK-NFM	FÜ AS05-NFM	FÜ Inulin-NFM
pH-Wert	6,47	5,97	5,62	5,17	5,94	5,53	5,33	4,91
SCFA-konzentration [mmol/l]	43,93	84,97	62,17	116,60	135,89	161,50	132,45	161,81
GS-Gehalt [µg/ml]	6,13	1,03	2,33	0,43	36,13	11,67	48,03	40,90
Ammoniak-konzentration [mmol/l]	17,73	26,99	8,72	4,12	83,91	81,34	53,96	42,20

4.3 Modifikation des Wachstums und des Metabolismus von HT29-Zellen durch die Testsubstanzen

Im Gegensatz zu den HT29-Zellen verfügen Darmzellen *in vivo*, v.a. durch eine schützende Mucusschicht, über einen erhöhten Zellschutz [Silbernagl & Despopoulos, 2001]. Sie reagieren somit unempfindlicher auf Wirkkomponenten der Faecesmatrix bzw. des Faeceswassers als Zellen in Kultur. Trotz der daraus resultierenden Problematik der Übertragbarkeit von Zellkulturuntersuchungen, können dennoch wichtige Kenntnisse zu biologischen Effekten bzw. schädigenden oder protektiven Potentialen von Testsubstanzen gewonnen werden.

4.3.1 Beeinflussung der Zellproliferation

Nach dreitägiger Beobachtung des Proliferationsverhaltens der HT29-Zellen konnte, in Relation zu der Mediumkontrolle, eine Reduktion der Zellzahl durch alle FÜ in den Konzentrationen 2,5 bis 20% (v/v) festgestellt werden. Dabei zeigten die FÜ(NFM) bzw. die darin enthaltenen Komponenten, mit Ausnahme der FÜ Inulin, einen gegenüber der FÜ(AFM) deutlich stärker wachstumsinhibierenden Effekt (Abb. 3-6 bis 3-8, Tabelle 3-3). Aufgrund der Komplexität eines FÜ, erweist es sich als schwierig, solche Effekte auf einzelne Inhaltsstoffe oder Stoffgruppen zurückzuführen. Die Fermentation nach Durchführung der NFM ergab gegenüber der AFM deutlich erhöhte SCFA-, Ammoniak und Gallensäurekonzentration, wodurch ein Einfluss dieser Komponenten in Betracht gezogen werden muss. In verschiedenen Studien konnte eine dosisabhängige, zellwachstumsregulatorische Wirkung der als Fermentationsprodukt gebildeten SCFA (v.a. Butyrat und Propionat) gegenüber dem Darmepithel, im Zusammenhang mit einer guten Resorbierbarkeit [Topping & Clifton, 2001], belegt werden. Coradini et al. [2000] konnte nach 72h eine 75%ige Wachstumsreduktion von HT29-Zellen durch eine Inkubation mit Butyrat in der Konzentration 4mM feststellen. Die für die Proliferationsuntersuchungen in den Konzentrationen 10 & 20% (v/v) eingesetzten FÜ(NFM) wiesen vergleichbare und größere Butyratkonzentrationen auf, mit einer teilweise kompletten Reduktion der Zellzahl nach 72h. Butyrat wird unter anderem durch eine Hemmung der Histonacetylierung und dem daraus resultierenden Zellzyklusarrest mit einer wachstumsregulatorischen Funktion gegenüber transformierter Darmepithelzellen in Verbindung gebracht [Davie, 2003; Kautenburger et al., 2005; Kobayashi et al., 2003]. Neben dem Butyrat besitzen aber auch Acetat, Propionat und Valeriat antiproliferative Potentiale. Durch Inkubation von HT29-Zellen mit einem künstlichen SCFA-Mix (72h) ermittelten Beyer-Sehlmeier et al. [2003] EC_{50} -Werte dieser SCFA. Die Werte lagen bei 25,6 mM für Acetat, 2,7 mM für Propionat und 10,8 mM für Valeriat. Im Vergleich zu den Proliferationsuntersuchungen der hier vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur im Falle des Propionats vergleichbare Konzentrationen erreicht. Die FÜ(NFM) wiesen ab einer Konzentration von 10% (v/v) in etwa eine Propionatkonzentration von 2,5mM (Acetat: ca. 8mM; Valeriat: ca. 0,1 – 0,5mM) auf (siehe Abb. 3-1 bis

3-3). In dieser Konzentration reduzierten die FÜ(NFM) (v.a. FÜ AS05(NFM)) die Zellzahl bereits nach 24h um etwa 50% gegenüber der Mediumkontrolle (siehe Abb. 3-6 bis 3-8), wodurch der antiproliferative Einfluss zusätzlicher Komponenten der FÜ, im Vergleich zur Inkubation mit einem reinen SCFA-Mix [Beyer-Sehlmeier et al., 2003], sichtbar wird.

So könnte zum Beispiel Ammoniak durch die Beeinflussung metabolischer Prozesse [Pkt. 4.2.3] einen wachstumsmodulierenden Effekt gegenüber HT29-Zellen, v.a. während der Inkubation mit den FÜ(NFM) (siehe Abb. 3-5), erzielt haben. Im sauren Milieu sinkt die zelluläre Aufnahme von Ammoniak [Ichikawa & Sakata, 1998], weshalb durch die Inkubation mit FÜ unterschiedlichen pH-Wertes auch von einem FÜ-abhängigen Einfluss des Ammoniaks, hinsichtlich einer Modulation des Zellwachstums, ausgegangen werden kann (antiproliferativer Effekt Ammoniak: z.B. FÜ WK > FÜ Inulin).

Bei Betrachtung der Ergebnisse des DAPI-Assay beider FM im Vergleich (siehe Abb. 3-6 bis 3-8) erscheinen die bei Durchführung der NFM hinzugegebenen Gallensäuren, bei gleichzeitig geringen Gallensäuregehalten der FÜ(AFM) (siehe Abb. 3-4), als eine weitere, wesentliche Einflussgröße auf das Wachstum der HT29-Zellen. In verschiedenen Studien konnten zytotoxische Effekte der GS festgestellt werden ($> 100\mu\text{M}$) [De Boever et al., 2000b; Milovic et al., 2002], welche trotz niedrigerer Konzentrationen in den FÜ(NFM) zu einer Beeinflussung des antiproliferativen Potentials beigetragen haben könnten. Die Veränderung des proliferativen Verhaltens der HT29-Zellen nach Inkubation mit den verschiedenen Fermentationsmedien (siehe Abb. 3-9) lässt einen wachstumsinhibierenden Effekt der GS als noch deutlicher erscheinen. Während die alleinige Inkubation mit dem bei der AFM verwendeten Kaliumphosphatpuffer und dem bei der NFM verwendeten Nährmedium einen vergleichbaren antiproliferativen Effekt ergab, führte die Inkubation mit dem Nährmedium (ohne Testsubstanz) nach 5-stündiger Magen- und Dünndarmsimulation, mit der Addition des intestinalen Extraktes, zu einer zusätzlichen Einschränkung des Zellwachstums (siehe EC_{50} -Werte, Tab. 3-6). Die GS-Konzentration entsprach dabei in etwa einem Drittel der von De Boever et al. [2000b] im SHIME-Modell minimal eingesetzten Menge, welche einen zytotoxischen Effekt ergab. Hinweise bezüglich eines wachstumsmodulierenden Einflusses der ebenfalls als Bestandteile des

intestinalen Extraktes vorkommenden Pankreasenzyme konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Obwohl das reine Nährmedium und der Kaliumphosphatpuffer vergleichbare Kurvenverläufe zeigten, ließ sich ein stärkerer antiproliferativer Effekt des Nährmediums feststellen (Tab. 3-6, Abb. 3-9, v.a. Inkubation mit 20% (v/v)). Dies deutet auf wachstumsinhibitorische Einflüsse weiterer Komponenten des Nährmediums, wie z.B. Hämin [Glei et al., 2005], hin. Wie stark sich eine zusätzliche bakterielle Verstoffwechslung der Komponenten des Nährmediums auf die Proliferation von HT29-Zellen auswirkt, verdeutlicht der Vergleich der Ergebnisse nach Inkubation mit den FÜ Testsubstanzen(NFM) und dem FÜ Blank(NFM). Nur die Inkubation mit dem FÜ AS05(NFM) führte dabei zu einem zusätzlichen antiproliferativen Effekt gegenüber dem FÜ Blank(NFM), wobei der FÜ Inulin(NFM) und v.a. der FÜ WK(NFM) einen nahezu identischen Kurvenverlauf im Vergleich zum Blank zeigten. Im Gegensatz dazu konnte nach Durchführung der AFM durch jede der FÜ Testsubstanzen ein wachstumsinhibierender Effekt gegenüber dem Blank erzielt werden. Die allgemein in den FÜ(NFM) gesteigerte SCFA- und Ammoniak-Bildung sowie die Zugabe von Gallensäuren scheinen dabei die additiven antiproliferativen Effekte, welche von der Fermentation der Testsubstanzen ausgehen (z.B. signifikant erhöhte Butyratkonzentration des FÜ Inulin(NFM) gegenüber dem Blank), in ihrer Wirkung zu minimieren. So wäre im Fall der nahezu identischen Proliferationsergebnisse der Inkubation mit dem FÜ WK(NFM) und FÜ Blank(NFM) eine kompensatorische Wirkung zwischen SCFA und GS durchaus denkbar. Da die DCA im FÜ Blank(NFM) signifikant gegenüber dem FÜ WK(NFM) erhöht ist, könnten im Gegensatz die additiven zellwachstumshemmenden Effekte der Komponenten des FÜ WK(NFM), z.B. durch eine gegenüber dem Blank signifikant erhöhte Butyratkonzentration, in ihrer Wirkung aufgehoben worden sein. Alleinig die „neue“ Fermentation mit AS05 konnte gegenüber dem Blank deutlich additive Effekte auf die Reduktion des Wachstums der HT29-Zellen, sowohl nach Durchführung der NFM als auch der AFM, mit EC_{50} -Werten von 3,89% (v/v) (NFM) und 8,63% (v/v) (AFM) bereits nach 24h erzielen. In verschiedenen Studien konnten wachstumsinhibierende Effekte von Apfel-Polyphenolen gegenüber transformierter Kolonepithelzellen, wie den HT29-Zellen, nachgewiesen werden [Veeriah et al., 2006]. Eine Inhibierung der Expression des epidermal growth factor receptors

(EGFR) gilt dabei als eine mögliche Ursache der antiproliferativen Wirkung von Apfel-Polyphenolen, wie z.B. Quercetin [Kern et al., 2005]. Veeriah et al. [2007] konnte durch *in vitro* Fermentationsversuche (entsprechend der AFM) mit Apfelpolyphenol-Extrakten eine Abnahme der Bioaktivität von Polyphenolen im Darm, durch bakterielle Degradation zeigen. In Folge einer enzymatisch-glykosidischen Trennung der Polyphenole vom Zuckerrest, während der Dünndarmsimulation der NFM, kann von einer bereits vor dem Start der eigentlichen Fermentation erhöhten Konzentration freier Polyphenole in der Fermentationssuspension ausgegangen werden. In Folge dessen könnte die Fermentation nach Durchführung der NFM zu einem verstärkten Abbau der Polyphenole gegenüber der AFM und dadurch zu einem verminderten wachstumsinhibitorischen Potential der FÜ AS05(NFM) im Vergleich zu den FÜ AS05(AFM) geführt haben. Aufgrund der zusätzlichen Fermentation der Komponenten des Nährmediums konnten die Proliferationsergebnisse diese Vermutung jedoch nicht belegen.

Die Proliferationsergebnisse der FÜ Inulin(AFM) und FÜ WK(AFM) waren mit Resultaten bisheriger Untersuchungen vergleichbar [Glei et al, 2006; Munjal, persönliche Korrespondenz]. Der antiproliferative Effekt dieser FÜ scheint dabei ebenfalls mit der Menge gebildeter SCFA in Zusammenhang zu stehen.

4.3.2 Beeinflussung der metabolischen Aktivität

Die Messung der testsubstanzabhängigen Modifikation des HT29-Zellmetabolismus erfolgte parallel zur Zellzahl- bzw. Zellproliferationsmessung mittels CTB-Assay. Dadurch kann der in Abhängigkeit von der zellulären metabolischen Aktivität ermittelte CTB-Fluoreszenzwert auf die gleichzeitig im Testsystem vorherrschende Zellmenge bezogen werden. Bei alleiniger Betrachtung des CTB-Ergebnisses konnte zwar eine Abnahme der metabolischen Aktivität mit steigender Konzentration der Testsubstanzen und des Blanks gegenüber der Mediumkontrolle festgestellt werden, jedoch erscheint diese Abnahme, bei gleichzeitiger Betrachtung der Proliferationsergebnisse, als logisches Resultat parallel sinkender Zellzahlen und nicht als eine Folge der

Inkubation mit den Testsubstanzen (Abb. 3-10 bis 3-13, Tabelle 3-7). So führte die Inkubation mit den stärker wachstumsinhibierenden FÜ(NFM) und den darin enthaltenen höher konzentrierten Wirkkomponenten SCFA, GS oder Ammoniak auch zu einer stärkeren Einschränkung der metabolischen Aktivität.

Die sinkenden DAPI- und CTB-Werte erscheinen durch die Inkubation mit den FÜ Inulin und FÜ WK (AFM & NFM) so synchron, dass eine Beeinflussung der metabolischen Aktivität durch diese Testsubstanzen ausgeschlossen werden kann. Dies bestätigt sich bei Betrachtung der ermittelten relativen metabolischen Aktivität (Tabelle 3-7). Beim Vergleich der Kurvenverläufe des DAPI- und CTB-Ergebnisses bzw. bei Betrachtung der relativen metabolischen Aktivität nach Behandlung mit den FÜ AS05 (AFM & NFM) lässt sich gegenüber den anderen Testsubstanzen jedoch eine Abnahme des Metabolismus der HT29-Zellen feststellen. Dieses Ergebnis scheint mit dem stark antiproliferativen Potential der Apfel-Polyphenole, bzw. ihrer durch bakterielle Degradation im Dickdarm gebildeten Metabolite, gegenüber transformierter Kolonozyten wie den HT29-Zellen in Verbindung zu stehen [Veeriah et al., 2007]. So könnte die Abnahme der metabolischen Aktivität der HT29-Zellen, nach Inkubation mit den FÜ AS05, mit einer Apoptoseinduktion oder einer Hemmung der Signaltransduktion (z.B. Hemmung des EGF-Signaltransduktionsweg) in Verbindung stehen [Kern et al., 2005]. Im Widerspruch dazu konnten andere Studien in transformierten Zellen eine Steigerung des Metabolismus durch Induktion bestimmter Phase I- & Phase II-Enzyme (z.B. Monooxygenasen, Glutathion-S-Transferasen) nach Inkubation mit Pflanzenpolyphenolen zeigen [Moskaug et al., 2005; Veeriah et al., 2006]. Da der Abbau des Resazurin der CTB-Reagenz zum fluoreszierenden Resorufin jedoch primär durch zelluläre Reduktasen erfolgt [Promega Homepage], schließt die Induktion der genannten Phase I- & Phase II-Enzyme eine allgemeine Einschränkung der metabolischen Aktivität transformierter Zellen durch die Polyphenole nicht aus.

4.4 Genotoxische Schädwirkung der Testsubstanzen

Die quantitative Beurteilung genotoxischer Potentiale erfolgte am Beispiel der FÜ Inulin und FÜ Blank in den Konzentrationen 5 & 10% (v/v). Die Messung mittels der Methode des Comet Assays ergab dabei einen maximalen Tail Intensity-Wert von 7,2% (FÜ Inulin(NFM)), wodurch von einem eher geringen genotoxischen Potential der FÜ ausgegangen werden kann (Abb. 3-14). Da die Inkubation mit den FÜ in der Konzentration 10% (v/v), außer im Falle des FÜ Inulin(AFM), in einem signifikanten Anstieg der genotoxischen Schädwirkung im Vergleich zu der Inkubation mit den FÜ in der Konzentration 5% (v/v) resultierte, kann jedoch von einer dosisabhängigen Induktion genotoxischer Schäden durch die FÜ ausgegangen werden. Als mögliche Ursache hierfür können genotoxisch wirkende Schadstoffe, wie z.B. heterozyklische Amine oder reaktive Sauerstoffspezies genannt werden, welche sich in der faecalen Matrix der für die Fermentationsversuche verwendeten Faecesproben befanden. Reaktive Sauerstoffspezies könnten sich zusätzlich während der Fermentation oder während der 60-minütigen Inkubation, bei Durchführung des Comet Assays, durch Oxidationsreaktionen gebildet haben. Hinsichtlich der Induktion genotoxischer Schäden wiesen die FÜ(NFM), wie in den Ergebnissen zuvor, einen verstärkten Effekt gegenüber den FÜ(AFM) auf. Da auch der FÜ Blank(NFM) gegenüber dem FÜ Blank(AFM) zu einer Erhöhung der genotoxischen Schädwirkung geführt hat (signifikant bei 5%), kann von einem zusätzlichen Einfluss der Komponenten des Nährmediums und des intestinalen Extrakts ausgegangen werden. In diesem Zusammenhang wäre u.a. ein Einfluss der zugeführten Gallensäuren, v.a. im Falle des FÜ Blank(NFM) mit einem erhöhten Gehalt der in bestimmten Konzentrationen genotoxisch wirkenden DCA [Milovic et al., 2002], denkbar. Da die Tail Intensity-Werte nach Inkubation mit den FÜ Inulin (AFM & NFM) und FÜ Blank (AFM & NFM) vergleichbar waren, scheint die Fermentation mit Inulin im Vergleich zur Kontrolle, zumindest nach 60-minütiger Inkubation der Zellen mit den FÜ in den Konzentrationen 5 & 10% (v/v), keinen zusätzlichen Effekt in Bezug auf Senkung oder Steigerung genotoxischer Schäden erzielt zu haben.

Die genotoxische Schädwirkung des FÜ Inulin(AFM) korrelierte mit bisherigen Befunden [Munjal, persönliche Korrespondenz].

4.5 Fazit

Mit kontinuierlichen Fermentationssystemen wie dem SHIME-Modell lassen sich Veränderungen des Wachstums bestimmter Mikroorganismen, ihrer Enzymaktivitäten oder ihrer Fermentationsprodukte, in Abhängigkeit wechselnder Phasen, mit und ohne Applikation einer Testsubstanz, über einen z.T. mehrwöchigen Versuchszeitraum beobachten und analysieren. Dabei ist die Verwendung eines Darmlumen-simulierenden Nährmediums, für die Stabilisierung und dauerhafte Aufrechterhaltung einer faecalen Flora unumgänglich. Für die im Vergleich dazu schnelle Durchführung einer one-batch-*in vitro*-Fermentation, mit einer Beobachtung testsubstanzabhängiger Effekte über einen Zeitraum von 24h, erweist sich ein Nährmedium durch zusätzlich fermentierbare Komponenten, v.a. für Untersuchungen in zellulären Testsystemen, als nachteilig. Zusätzlich erschwerte es den Vergleich mit den nach der Methode von Barry et al. [1995] gewonnenen Fermentationsüberständen, weshalb sich Effekte einer zusätzlichen Simulation der Prozesse des oberen Verdauungstraktes nur bedingt feststellen ließen.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Mit der *in vitro* Fermentation lassen sich testsubstanzabhängige Prozesse des Kolons, hinsichtlich des Wachstums und der Aktivität bestimmter Mikroflora, in Zusammenhang mit einer Produktion von Metaboliten und der daraus resultierenden Milieubildung beobachten und untersuchen. Dies macht die *in vitro* Fermentation zu einem geeigneten Hilfsmittel bei der Analyse bestimmter Nahrungsmittel bzw. Nahrungsmittelinhaltsstoffe, hinsichtlich deren Einfluss auf die Darmkrebsbildung. Ziel dieser Arbeit war es, die one-batch-*in vitro*-Fermentation nach Barry et al. [1995] durch eine vorherige Simulation der Prozesse des oberen Verdauungstraktes zu modifizieren, um eine Anpassung an die *in vivo* Bedingungen zu erreichen. Zur Beurteilung des Einflusses der Versuchsmodifikation wurden gewonnene Fermentationsüberstände, nach paralleler Durchführung der „alten“ und „neuen“ Fermentationsmethode (Testsubstanzen: Inulin, Apfelpolyphenol-Extrakt (AS05), Weizenkleie), charakterisiert und verglichen. Vergleichskriterien waren der pH-Wert, die Menge gebildeter Fermentationsprodukte bzw. –metabolite (SCFA, GS, Ammoniak), die Modifikation des Wachstums und des Metabolismus kultivierter Dickdarmkrebszellen sowie die Induktion genotoxischer Schäden.

Die zusätzliche Simulation der Verdauungsprozesse des Magens und Dünndarms, mit der Einhaltung einer bestimmten organspezifischen Simulationsdauer, der Addition eines Verdauungsssekretes und der Einstellung eines entsprechenden Milieus (pH-Wert, Sauerstoffatmosphäre) erfolgte in Anlehnung an das von Molly et al. [1993] entwickelte, kontinuierliche *in vitro* Fermentationssystem (SHIME-Modell) unter Verwendung eines Nährmediums, welches Komponenten des Darmlumens beinhaltet und zugleich der Stabilisierung faecaler Flora dient.

Die Durchführung der NFM, in Gegenwart dieses Mediums, führte im Vergleich zur AFM, mit der Verwendung eines K/P-Puffers, zu deutlich erhöhten Konzentrationen der Fermentationsprodukte SCFA und Ammoniak im FÜ, welche allerdings durchaus physiologischen Konzentrationen entsprachen und dadurch *in vivo* Bedingungen simulierten. Im Zusammenhang mit den resultierenden pH-Werten ließen sich dadurch testsubstanzabhängige Einflüsse auf Wachstum und Aktivität bestimmter Mikrobiota des Darms besser erkennen. So konnte

beispielsweise eine gute Fermentierbarkeit des Inulins durch vermehrte SCFA-Bildung im Zusammenhang mit einer pH-Wert-Senkung (entsprechend bisheriger Befunde) und einer daraus resultierenden Hemmung ammoniakproduzierender Keime, gegenüber der AFM, deutlicher dargestellt werden. Allerdings ließ die Durchführung der AFM bei alleiniger Betrachtung der SCFA-Bildung, trotz niedrigerer Werte aufgrund des nicht fermentierbaren K/P-Puffers, deutlichere Effekte der Testsubstanzen gegenüber dem Blank erkennen. In Bezug auf die GS-Zusammensetzung ermöglichte wiederum die Durchführung der NFM, mit einer Addition von Gallensäuren während der Dünndarmsimulation, eine verbesserte Analyse der Einflüsse, welche von einer testsubstanzabhängigen Änderungen der Darmfloraaktivität und des Darmmilieus ausgehen. So konnten potentiell gesundheitsfördernde Effekte der Testsubstanzen Inulin und AS05, durch eine Inhibierung der Bildung sekundärer GS am Beispiel der DCA beobachtet werden. Für die Anwendung der FÜ in zellulären Testsystemen erwies sich die Durchführung der NFM, in Zusammenhang mit der Verwendung des Nährmediums und des intestinalen Extrakts, als weniger geeignet. So konnte aufgrund einer erhöhten Konzentration zytotoxisch und z.T. genotoxisch wirkender Inhaltsstoffe, außer im Fall der Fermentation mit AS05, kein wachstumsinhibierender Effekt der Testsubstanzen gegenüber HT29-Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, welcher bei Betrachtung der Ergebnisse der FÜ(AFME) jedoch durchaus bestand.

Für die schnelle Durchführung einer one-batch-*in vitro*-Fermentation, mit der Beobachtung testsubstanzabhängiger Effekte über einen Zeitraum von 24h, erwies sich die Verwendung eines Nährmediums mit zusätzlich fermentierbaren Komponenten, v.a. für Untersuchungen in zellulären Testsystemen, als nachteilig. Daher sollte zukünftig die Durchführung der NFM mit einem komponentenarmen Zellkulturmedium oder Salzpuffer als Fermentationsmedium erfolgen, was zugleich mögliche additive Effekte, welche von einer Simulation der Prozesse des oberen Verdauungstraktes ausgehen, gegenüber den FÜ der AFM und der Kontrolle erkennbarer machen würde. Diese Effekte könnten zusätzlich durch die Verwendung komplexer Lebensmittel als Testsubstanzen, mit Anteilen verdaulicher und unverdaulicher Inhaltsstoffe, verstärkt werden. Durch eine Veränderung der Zufuhr von Enzymen und Gallensäuren, hinsichtlich Art und

Menge (z.B. Verwendung von Pepsin während der Magensimulation), kann die Methode weiter optimiert werden. Dabei sollte vor einer Änderung der Gallensäurekonzentration im System ein konzentrationsabhängiger Test mit reinen Gallensäureextrakten, hinsichtlich des zyto- und genotoxischen Potentials gegenüber kultivierter Zelllinien, erfolgen. Abschließend empfiehlt sich für eine weitere Anpassung des Systems an die Bedingungen *in vivo*, eine zusätzliche Simulation der Resorption von Spaltprodukten durchzuführen. Neben einer eher problematisch zu betrachtenden Abtrennung großmolekularer, unverdauter Nahrungsbestandteile nach der Dünndarmsimulation durch Fällung und Zentrifugation, lässt sich eine Resorptionssimulation über die Verwendung von Dialysemembranen relativ einfach realisieren.

6 Literaturverzeichnis

Zeitschriften:

- Adjei AA (2001): *Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy*. Journal of the National Cancer Institute. **93**: 1062-1074
- Barry JL, Hoebler C, Macfarlane GT, Macfarlane S, Mathers JC, Reed KA, Mortensen PB, Nordgaard I, Rowland IR, Rumney CJ (1995): *Estimation of the fermentability of dietary fibre in vitro: a European interlaboratory study*. Brit J of Nutrition. **74**: 303-322
- Berlau J, Glei M, Pool-Zobel BL (2004): *Colon cancer risk from nutrition*. Bioanal. Chem. **378**: 737-743
- Beyer-Sehlmeyer G, Glei M, Hartmann F, Hughes R, Persin C, Boehm V, Rowland IR, Schubert R, Jahreis G, Pool-Zobel BL (2003): *Butyrate is only one of several growth inhibitors produced during gut floramediated fermentation of dietary fibre sources*. Br J Nutr. **90**: 1057–1070
- Bienz M, Clevers H (2000): *Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling*. Cell **103**: 311–320
- Bingham SA, Day NE, Luen R, et al. (2003): *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. Lancet. **361**: 1496–1501
- Bodmer WF (2006): *Cancer genetics: colorectal cancer as a model*. J. Hum. Genet. **51**: 391 – 396
- Boman BM, Walters R, Fields JZ, Kovatich AJ, Zhang T, Isenberg GA, Goldstein SD, Palazzo JP (2004): *Colonic crypt changes during adenoma development in familial adenomatous polyposis: immunohistochemical evidence for expansion of the crypt base cell population*. Am J Pathol. **165**(5): 1489-1498
- Boyle P, Ferlay J 2005: *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. Annals of Oncology. **16**(3): 481–488
- Branca F, Hanley AB, Pool-Zobel BL, Verhagen H (2001): *Biomarkers in disease and health*. Br. J Nutr. **86**: Suppl 1: 55-92
- Campbell JM, Fahey GC Jr, Wolf BW (1997): *Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats*. J Nutr **127**: 130–136

- Chaney AL, Marbach EP (1962): *Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia*. Clin. Chem. **8**: 130-132
- Chapkin RS, Fan YY, Lupton JR (2000): *Effect of diet on colonic-programmed cell death: molecular mechanism of action*. Toxicology Letters. **112-113**: 411-414
- Chaplin MF (1998): *Bile acids, fibre and colon cancer: the story unfolds*. J R Soc Health. **118**(1): 53-61
- Chen JH, Tsai CH, Liu TZ, Chen SC (2001): *Antioxidant action of tannic acid and its related compounds: their interaction with superoxide anion, hydroxyl radical and complexation abilities with ferrous ions*. J. Biomed. Lab. Sci. **13**: 6-10
- Collins AR (1999): *Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer*. BioEssays. **21**: 238-246
- Coradini D, Pellizzaro C, Marimpietri D, Abolafio G, Daidone MG (2000): *Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells*. Cell Prolif. **33**: 139-146
- Davie JR (2003): *Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate*. J Nutr. **133**: 2485-2493
- Darcy-Vrillon B, Cherbuy C, Morel MT, Durand M, Due'e PH (1996): *Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes: modulation by NH₄⁺*. Mol. Cell. Biochem. **156**: 145-151
- De Boever P, Deplancke B, Verstraete W (2000a): *Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder*. J Nutr. **130**: 2599-2606
- De Boever P, Wouters R, Verschaeve L, Berckmans P, Schoeters G, Verstraete W (2000b): *Protective effect of the bile salt hydrolase-active Lactobacillus reuteri against bile salt cytotoxicity*. Appl Microbiol Biotechnol. **53**: 709-714
- Decroos K, Eeckhaut E, Possemiers S, Verstraete W (2006): *Administration of Equol Producing Bacteria Alters the Equol Production Status in the Simulator of the Gastrointestinal Microbial Ecosystem (SHIME)*. J. Nutr. **136**: 946-952
- De Kok TMCM, van Maanen JMS (2000): *Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk*. Mutation Research. **463**: 53-101
- Divisi D, Di Tommaso S, Salvemini S, Garramone M, Crisci R (2006): *Diet and cancer*. Acta Bio-Medica. **77**(2): 118-123

- Ebert MN, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel UM, Kautenburger T, Becker TW, Pool-Zobel BL (2001): *Butyrate-induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxynonenal*. Nutr Cancer. **41**: 156–164
- Ebert MN, Klinder A, Schaeferhenrich A, Peters WHM, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL (2003): *Expression of glutathione S-transferases (GST) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate*. Carcinogenesis. **24**: 1637-1644
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell Growth Diff. **61**: 759 - 767
- Femia AP, Luceri C, Dolaro P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, Clune Y, Collins KJ, Paglierani M, Caderni G (2002): *Antitumourigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats*. Carcinogenesis. **23**: 1953–1960
- Ferguson LR (1999a): *Natural and man-made mutagens and carcinogens in the diet. Introduction to special issue of mutation research*. Mutat Res. **443**:1-10
- Ferguson LR, Harris PJ (1999b): *Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals*. Eur. J. Cancer Prev. **8**: 17-25
- Ferguson LR, Chavan RR, Harris PJ (2001): *Changing Concepts of Dietary Fiber: Implications for Carcinogenesis*. Nutr Cancer. **39**(2): 155-169
- Ferguson LR, Harris PJ (2003): *The dietary fibre debate: more food for thought – commentary*. Lancet. **361**: 1487–1488
- Fodde R, Smits R, Clevers H (2001): *APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer*. Nat. Rev. Cancer **1**: 55-67.
- Fogh J, Trempe X (1975): *Human Tumor Cells in Vitro*. In Fogh, J. (ed), *Human tumor cells in vitro*. Plenum Press, New York: 115-159.
- Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, et al. (2004): *Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis*. Clin Cancer Res. **10**: 4015-4021
- Fuchs CS, Giovannucci E, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC (1999): *Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women*. N Engl J Med. **340**: 169–176
- Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT (1988): *Use of a threestage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulphate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria*. Appl Environ Microbiol **54**(11): 2750-2755

- Gibson GR, Roberfroid MB (1995): *Dietary modulation of the human colonic microbiota—introducing the concept of prebiotics*. J. Nutr. **125**: 1401–1412
- Gibson GR (1999): *Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin*. J. Nutr. **129**: 1438S-1441S
- Glei M, Klenow S, Sauer J, Wegewitz U, Richter K, Pool-Zobel BL (2005): *Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes*. Mutation Research. **594**: 162–171
- Glei M, Hofmann T, Küster K, Hollmann J, Lindhauer MG, Pool-Zobel BL (2006): *Both wheat (*Triticum aestivum*) bran arabinoxylans and gut flora-mediated fermentation products protect human colon cells from genotoxic activities of 4-Hydroxynonenal and Hydrogen Peroxide*. J. Agric. Food Chem. **54**: 2088-2095
- Gonzalez CA, Riboli E (2006): *Diet and cancer prevention: where we are, where we are going*. Nutr Cancer. **56**(2): 225-231
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): *The Hallmarks of Cancer*. Cell. **100**: 57–70
- Hao X, Pretlow PTG, Rao JS, Pretlow TP (2001): *β -Catenin Expression Is Altered in Human Colonic Aberrant Crypt Foci*. Cancer Research. **61**: 8085-8088
- Hague A, Butt AJ, Paraskeva A (1996): *The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis?* Proceedings of the Nutrition Society. **55**: 937-943
- Harris PJ, Ferguson LR (1999): *Dietary fibres may protect or enhance carcinogenesis*. Mutat Res. **443**: 95-110
- Hill MJ (1995): *Bacteria and fat digestion*. In: Hill MJ (ed) Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology. Taylor and Francis, London, pp 131-142
- Hofmann AF (2007): *Biliary secretion and excretion in health and disease: Current concepts*. Annals of Hepatology. **6**(1): 15-27
- Hughes R, Rowland IR (2001): *Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon*. Carcinogenesis. **22**(1): 43-47
- Ichikawa H, Sakata T (1998): *Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous colonic infusion of ammonia or short-chain fatty acids is nonadditive*. J. Nutr. **128**: 843–847
- Iwamoto M., Ahnen DJ, Franklin WA, Maltzman TH (2000): *Expression of β -catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues*. Carcinogenesis. **21**: 1935-1940

- Jan G, Belzacq AS, Haouzi D, Rouault A, Metivier D, Kroemer G, Brenner C (2002): *Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via shortchain fatty acids acting on mitochondria*. Cell Death Differ. **9**: 179–188
- Kautenburger T, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Haag N, Kühler S, Küchler A, Weise A, Marian B, Peters WHM, Liehr T, Claussen U, Pool-Zobel BL (2005): *The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells*. J Cancer Res Clin Oncol. **131**(10): 692-700
- Kawai K, Viars C, Arden K, Tarin D, Urquidi V, Goodison S (2002): *Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line*. Genes Chromosomes Cancer **34**: 1-8.
- Keller S, Jahreis G (2004): *Determination of underivatized sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring in faeces*. Journal of Chromatography B. **813**: 199-207
- Kelly D, Conway S, Aminov R (2005): *Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation*. Trends Immunol. **26**: 326–333
- Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D (2005): *Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract*. Mol Nutr Food Res. **49**(4): 317-28
- Kiefer J, Beyer-Sehlmeyer G, Pool-Zobel BL (2006): *Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells*. Br J Nutr. **96**(5): 803-810
- Kiessling G, Schneider J, Jahreis G (2002): *Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol*. Eur J Clin Nutr. **56**: 843-849
- Klinder A, Förster A, Caderni G, Femia AP, Pool-Zobel BL (2004): *Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis) and their synbiotic combination*. Nutr Cancer **49**: 144–155
- Kobayashi H, Tan ME, Fleming SE (2003): *Sodium butyrate inhibits cell growth and stimulates p21^{wap}/CIP1 protein in human colonic adenocarcinoma cells independently of p53 status*. Nutr Cancer. **46**: 202–211
- Kontula P, Jaskari J, Nollet L et al. (1998): *The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota*. Applied Microbiology and Biotechnology. **50**: 246-252

- Krul C, Luiten-Schuite A, Tenfelde A, van Ommen B, Verhagen H, Havenaar R (2001): *Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model*. Mutat Res. **474**(1-2): 71-85
- Krul C, Humblot C, Philippe C, Vermeulen M, van Nuenen M, Havenaar R, Rabot S (2002): *Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model*. Carcinogenesis. **23**: 1009-1016
- Le Marchand L (2002): *Cancer preventive effects of flavonoids-a review*. Biomed. Pharmacother. **56**: 296 – 301
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC (2002): *The colorectal adenoma-carcinoma sequence*. Brit. J. Sur. **89**: 845-860
- Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C (1986): *Protein degradation by human intestinal bacteria*. J. General Microbiol. **132**: 1647–1656
- Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR (1998a): *Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon*. Microb. Ecol. **35**: 180–187
- Macfarlane S, Quigley ME, Hopkins MJ, Newton DF, Macfarlane GT (1998b): *Polysaccharide degradation by human intestinal bacteria during growth under multi-substrate limiting conditions in a three-stage continuous culture system*. FEMS Microbiology Ecology. **26**: 231-243
- Macfarlane S, Woodmansey EJ, Macfarlane GT (2005): *Colonization of Mucin by Human Intestinal Bacteria and Establishment of Biofilm Communities in a Two-Stage Continuous Culture System*.
- Manderson K, Pinart M, Tuohy KM, Grace WE, Hotchkiss AT, Widmer W, Yadhav MP, Gibson GR, Rastall RA (2005): *In Vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream*. Appl Environ Microbiol. **71**(12): 8383-8389
- Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH (2000): *Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by shortchain fatty acids; comparison with trichostatin A, sulindac and curcumin, and implications for chemoprevention of colon cancer*. Cancer Res. **60**: 4561–4572
- Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JH (1997): *Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile*. J Dairy Sci. **80**(6): 1031-1037
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL (2005): *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system*. Cell. **122**: 107–118

- McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De M  o MP, Collins A (1993): *The single cell gel electrophoresis (comet assay): A European review*. Mutation Research. **288**: 47-63
- Meddah ATT, Yazourh A, Desmet I, Risbourg B, Verstraete W, Romond MB (2001): *The regulatory effects of whey retentate from Bifidobacteria fermented milk on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)*. J Appl Microbiology. **91**: 1110-1117
- Meyenfeldt M (2005): *Cancer-associated malnutrition: An introduction*. Eur.J. Onc.Nurs. **9**:35-38
- Milovic V, Teller IC, Faust D, Caspary WF, Stein J (2002): *Effects of deoxycholate on human colon cancer cells: apoptosis or proliferation*. European Journal of Clinical Investigation. **32**: 29–34
- Minekus M, Marteau P, Havenaar R, Huis in't Veld JHJ (1995): *A multicompartimental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine*. Altern. Lab. Anim. **23**: 197–209
- Minekus M, Smeets-Peeters M, Bernalier A, Marol-Bonnin S, Havenaar R, Marteau P, Alric M, Fonty G, Huis in't Veld JHJ (1999): *A computercontrolled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **53**: 108–114
- Molly K, Van de Woestyne M, Verstraete W (1993): *Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **39**: 254–258
- Mortensen PB, Clausen MR (1996): *Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease*. Scand. J Gastroenterol. **216**: 132-148
- Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad MCW, Blomhoff R (2005): *Polyphenols and glutathione synthesis regulation*. Am J Clin Nutr. **81**: 277–283
- Muramatsu K, Onodera S, Kikuchi M, Shiomi N (1994): *Substrate specificity and subsite affinities of β -fructofuranosidase from Bifidobacterium adolescentis G1*. Biosci Biotechnol Biochem **58**: 1642-1645
- Nollet L, Van de Velde I, Verstraete W (1997): *Effect of the addition of Peptostreptococcus productus ATCC35244 on the gastro-intestinal microbiota and its activity, as simulated in an in vitro simulator of the human gastro-intestinal tract*. Appl Microbiol Biotechnol. **48**: 99–104
- Nordgaard I, Mortensen PB (1995): *Digestive processes in the human colon*. Nutrition. **11**(1): 37-45

- Oberreuther-Moschner DL, Jahreis G, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL (2004): *Dietary intervention with the probiotics Lactobacillus acidophilus 145 and Bifidobacterium longum 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells*. Br. J. Nutr. **91**: 925-932
- O'Hara AM, Shanahan F (2006): *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO reports. **7**: 688-693
- Oßwald K, Becker TW, Grimm M, Jahreis G, Pool-Zobel BL (2000): *Inter- and intra- individual variation of fecal water-genotoxicity in human colon cells*. Mutation Research. **472**: 59-70
- Peters U, Sinha R, Chatterjee N, et al. (2003): *Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme*. Lancet. **361**: 1401-1405
- Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney CJ, Moretti M, Villarini M, Scassellati-Sforzolini G, Rowland IR (1996): *Lactobacillus- and Bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in colon cells of rats: prevention of carcinogen-induced damage in vivo and elucidation of involved mechanisms*. Nutr Cancer. **26**: 365-380
- Pool-Zobel BL (2005): *Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data*. Brit. J. Nutr. **93**(1): 73-90
- Reddy BS, Sharma C, Simi B, Engle A, Laakso K, Puska P, Korpela R (1987): *Metabolic epidemiology of colon cancer: effect of dietary fiber on fecal mutagens and bile acids in healthy subjects*. Cancer Res. **47**: 644-648
- Reddy BS, Hirose Y, Cohen LA, Simi B, Cooma I, Rao CV (2000): *Preventive potential of wheat bran fractions against experimental colon carcinogenesis: implications for human colon cancer prevention*. Cancer Res. **60**: 4792-4797
- Rieger MA, Parlesak A, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G, Bode C (1999): *A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'*. Carcinogenesis **20**(12): 2311-2316
- Rieger PT (2004): *The biology of cancer genetics*. Semin.Oncol.Nurs. **20**:145-154
- Roberfroid MB, Van Loo J, Gibson GR (1998): *The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products*. J Nutr. **128**: 11-19
- Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I, Bartsch H (2000): *Modulation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism*. Carcinogenesis **21**: 35-41

- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Spinozzi F, Agea E, Pelli MA, Morozzi G (2001): *Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumor cells*. Carcinogenesis. **22** (10): 1675-1680
- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC (1998): *Effect of bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats*. Carcinogenesis. **19**(2): 281-285
- Sachse C, Smith G, Wilkie MJV, Barrett JH, Waxman R, Sullivan F, Forman D, Bishop DT, Wolf CR (2002): *A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer*. Carcinogenesis **23**(11): 1839-1849
- Salovaara S, Alminger ML, Jonsson CE, Andlid T, Sandberg AS (2003): *Prolonged Transit Time through the Stomach and Small Intestine Improves Iron Dialyzability and Uptake in Vitro*. J. Agric. Food Chem. **51**: 5131-5136
- Sanders ME (1999): *Probiotics*. Food Technology. **53**(11): 67-77
- Sayar S, Jannink JL, White PJ (2007): *Digestion residues of typical and high-beta-glucan oat flours provide substrates for in vitro fermentation*. J Agric Food Chem. **55**(13): 5306-5311
- Schaeferhenrich A, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Kuechler A, Haag N, Weise A, Liehr T, Claussen U, Marian B, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL (2003a): *Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal*. Mutat. Res. 526: 19-32
- Schaeferhenrich A, Sendt W, Scheele J, Kuechler A, Liehr T, Claussen U, Rapp A, Greulich KO, Pool-Zobel BL. (2003b): *Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples*. Food Chem.Toxicol. **41**: 655-664
- Schatzkin A, Lanza E, Corle D, et al. (2000): *The Polyp Prevention Trial Study Group. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas*. N Engl J Med. **342**: 1149–1155
- Taper HS, Lemort C, Roberfroid MB (1998): *Inhibition effect of dietary inulin and oligofructose on the growth of transplantable mouse tumour*. Anticancer Res. **18**: 4123–4126
- Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergvist L, Hansen H, Holmberb L, Wolk A (2001): *Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst. **93**: 525–533
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, et al. (2000): *Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing*. Environmental and Molecular Mutagenesis. **35**: 206-221

- Topping DL, Clifton PM (2001): *Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides*. Physiol Rev. **81**: 1031-1064
- Turesky RJ (2002): *Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis*. Drug Met. Rev. **34**(3): 625-650
- Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W (2004): *Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem*. FEMS Microbiol Ecol. **51**: 143–153
- Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W (2007): *Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects*. J Applied Microbiology. **102**: 452–460
- Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL (2006): *Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics*. Mol. Carcinog. **45**: 164 - 174
- Veeriah S, Hofmann T, Glei M, Dietrich H, Will F, Schreier P, Knaup B, Pool-Zobel BL (2007): *Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29)*. J Agric Food Chem. **55**(8): 2892-2900
- Verghese M, Rao DR, Chawan CB, Williams LL, Shackelford L (2002): *Dietary inulin suppress azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colon tumors at the promotion stage in young fisher 344 rats*. J Nutr. **132**(9): 2809-2813
- Verwei M, Arkbåge K, Havenaar R, van den Berg H, Witthöft C, Schaafsma G (2003): *Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model*. J Nutr. **133**(7): 2377-2383
- WHO (2003 & 2006): *The World Health Report 2003 & 2006*. Genf.
- Willet W (2003): *Introduction to Session II: Cancer Prevention and Early Detection*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. **12**: 252
- Wollowski I, Ji S, Bakalinsky AT, Neudecker C, Pool-Zobel BL (1999): *Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats*. J Nutr. **129**: 77–82
- Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL (2001): *Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer*. Am. J Clin Nutr. **73**: 451S-455S

Wrong OM, Vince AJ, Waterlow JC (1985): *The contribution of endogenous urea to faecal ammonia in man, determined by ^{15}N labelling of plasma urea*. Clin. Sci. **68**: 193–199

Zoran DL, Turner ND, Taddeo SS, Chapkin RS, Lupton JR (1997): *Wheat bran diet reduces tumor incidence in a rat model of colon cancer independent of effects on distal luminal butyrate concentrations*. J Nutr. **127**: 2217-2225

Bücher:

Alberts B (2002): *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York

Biesalski HK, Grimm P (2002): *Taschenatlas der Ernährung*. 2. akt. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Elmadfa I, Leitzmann C (1998): *Ernährung des Menschen*. 3. Auflage. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Deutsche (DGE), Österreichische, Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (DACH) (2001): *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. 1. Auflage 2. korrigierter Nachdruck. DGE e.V., Frankfurt am Main

Fox MA, Whitesell JK (1995): *Organische Chemie - Grundlagen, Mechanismen, bioorganische Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001): *Molekulare Zellbiologie*. 4. Auflage. Spektrum, Akad. Verlag Gustav Fischer

Marquardt H & Schäfer S (2004): *Lehrbuch der Toxikologie*. 2. Auflage. Akademischer Verlag Spektrum GmbH Heidelberg, Berlin,

Silbernagl S, Despopoulos A (2001): *Taschenatlas der Physiologie*. 5. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Slavin JL (2000): *Dietary fibre and colon cancer*. Handbook of dietary fiber. Marcel Dekker Inc. 31-45

Watzl B, Leitzmann C (1999): *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart.

Dissertationen:

Müller N (2002): *Funktion von Smad4 als Tumorsuppressor in Kolon-Karzinomzellen*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

Schaeferhenrich A (2005): *Untersuchungen zu Mechanismen der ernährungsbedingten Kolonkarzinogenese: Genspezifische Schäden in humanen Kolonzellen durch endogene Risikofaktoren*. Dissertation Friedrich-Schiller Universität Jena

online- Quellen (Stand 06/2007):

Becker N, Wahrendorf J (2001): *Krebsatlas des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg*.
http://www.dkfz.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame6.htm

Boman BM, Benowitz S (2004): *Picture of colonepithel*. Kimmel Cancer Center - Thomas Jefferson University, Philadelphia.
<http://www.kimmelcancercenter.org/kcc/clinical/kccnews/BomanAACR-3-04.htm>

Boing DH, Kroke A (1999): *Krebsprävention durch Ernährung*. Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke, World Cancer Research Fund. <http://www.dife.de/dife/krebs/krebsbrosch99k.pdf>

Deutsche Krebshilfe in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke und der DGE (2005): *Präventionsratgeber Ernährung*.
http://www.dife.de/de/presse/praevratgeber_402.pdf

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut (2006): *Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends*. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken.
http://www.rki.de/cln_049/nn_196910/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Broschuere/kid2006,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/kid2006.pdf

Promega Homepage (Informationen zu CellTiter-Blue® - Reagenz):
<http://www.promega.com/applications/cellprolif/productprofiles/celltiterblueprofile.htm>

7 Anlagen

7.1 Zusammensetzung der Fermentationsmedien

AFM: anaerober Kaliumphosphatpuffer (0,1M; pH 7,0; in aqua bidest gelöst)

[Barry et al., 1995; Beyer-Sehlmeyer et al., 2003]

- 13,61 g KH_2PO_4
- 25 ml 2M NaOH

NFM: Nährmedium (g/l; in aqua bidest gelöst)

[Macfarlane et al., 2005]

- | | |
|--|--|
| • Polysaccharidgemisch = 7
(Stärke = 4, Pektin = 3) | • Hämin = 0,015 |
| • Mucin = 4 | • NaCl = 4,5 |
| • Hefe-Extrakt = 4,5 | • KCl = 2,5 |
| • Peptonwasser = 3 | • $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ = 0,45 |
| • Trypton = 3 | • KH_2PO_4 = 0,4 |
| • L-Cystein = 0,8 | • Tween 80 = 1ml/l |
| • Gallensalze = 0,4 | |

intestinales Extrakt (g/l; in aqua bidest gelöst)

[Meddah et al., 2001; De Boever et al., 2000a; Nollet et al., 1997]

- | | |
|-------------------------|--------------------|
| • NaHCO_3 = 12 | • Pancreatin = 0,9 |
| • Ovgall = 6 | |

Beim Pancreatin handelt es sich um einen Mix aus Pankreasenzymen (Amylasen, Proteasen, Lipasen) des Schweins.

Die Ochsgengalle beinhaltet CA (521 $\mu\text{g/ml}$) & DCA (382 $\mu\text{g/ml}$).

7.2 verwendete Testsubstanzen

Inulin – Raftilose®Synergy1 (ORAFIT, Tienen Belgien)

Bei Raftilose®Synergy1 handelt es sich um ein mit Oligofruktose angereichertes Inulinextrakt.

AS05 – Apfelpolyphenolextrakt:

(BMBF-Projekt, Teilvorhaben 1.2.; Forschungsanstalt Geisenheim)

1. Polyphenolzusammensetzung: [mg/l]

Die mittels HPLC-DAD ermittelte Polyphenol-Zusammensetzung des am 09.03.2006 hergestellten Apfelsaft-Extrakts AE05 aus 260 L klarem AS05 entspricht der eines typischen Mostapfelsaft-Extraktes. Analytische Ergebnisse zu dem Mastersaft OS05 trüb und klar sind im Zwischenbericht zur Förderperiode 2005 dargestellt.

Als Hauptkomponente liegt die Chlorogensäure vor, des Weiteren findet man in größeren Mengen die 4-Cumaroylchinasäure, sowie die beiden Dihydrochalcone Phloretin-2-xyloglucosid und Phlorizin. Die Einwaage betrug 1,0 g/L in 10 % Methanol; es wurden 32,8 % Polyphenole wiedergefunden. Die Zusammensetzung des AE05 weicht nur geringfügig von den Werten des im Labormaßstab hergestellten Extraktes ab (Daten siehe Zwischenbericht) und entspricht proportional der Polyphenolzusammensetzung des AS05 klar.

Tabelle 7-1: AS05-Polyphenolzusammensetzung [mg/l]

Procyanidin B1	1,8	Chlorogensäure	164,0
Catechin	3,8	Kryptochlorogensäure	20,9
Procyanidin B2	1,1	Kaffeesäure	3,1
Epicatechin	2,5	3-Cumaroyl-Chinasäure	2,0
Procyanidin C1	2,5	4-Cumaroyl-Chinasäure	71,6
Phloretin-2'-xyloglucosid	23,1	Cumarsäure	1,8
Unbek. Dihydrochalcon	0,0	Que-3-gal	1,5
Phlorizin	23,6	Que-3-glc	0,7
Cumaroylglucose	2,9	Que3-rha	1,2
Gesamt	328,1		

2. Saccharidzusammensetzung: [% (w/w)]

Die Saccharidzusammensetzung des Extrakts AE05 wurde nach Hydrolyse mit 1 M Schwefelsäure mittels Anionenaustauscherchromatographie mit gepulst-amperometrischer Detektion (HPAEC, Dionex BioLC, PA-10-Säule, externe Kalibrierung) bestimmt (Mittel aus Doppelbestimmungen). Als Hauptbestandteil tritt die Glucose auf.

Tabelle 7-2: AS05-Saccharidzusammensetzung [% (w/w)]

Fructose	0,0	Glucose	8,4
Rhamnose	0,2	Xylose	0,8
Arabinose	1,7	Galacturonsäure	0,3
Galactose	1,0	Glucuronsäure	0,3
Wiederfindung [%]	12,5		

Weizenkleie: [% (w/w)]

Tabelle 7-3: WK-Zusammensetzung [% (w/w)]

Wassergehalt	10,4	Gesamtarabinoxylangehalt	23
Asche:	7,6	Uronsäuregehalt : (bez. auf D-GlcUA)	1,4
Proteingehalt : (Kjeldahl, Faktor Nx5,7)	17,7	Gesamtballaststoffgehalt (AOAC-Methode, Megazyme)	53,5
Stärkegehalt (Ewers)	8,8	Phytinsäuregehalt:	5,2
β-Glucangehalt	2,8		

7.3 Geräte

Analysewaage (Sartorius Basic Plus)	Sartorius AG, Göttingen
Bildauswertungssystem (KOMET 4.0)	Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK
Brutschränke (Steri Cult 200)	Forma Scientific, Inc., USA
Elektrophoreseeinheit (Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop (Axiolab HB50)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrowellengerät (HMT 700B)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH
MTP-Fluoreszenz- Photometer	Tecan, Crailsheim
pH-Messgerät (EcoScan Ion 6)	Eutech Instruments, Nijkerk Netherlands (Europe AG)
Schüttelwasserbad	GFL mbH, Burgwedel
Sterile Werkbank (Herasafe H12)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Stomacher 400 Circulator	Seward, Norfolk, UK
Thermomixer (Compact)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Vortex (MS2 Minishaker)	IKA®
Wärmeplatte (HP 9060)	Labotect GmbH, Göttingen
Wasserbad MP-5	Julab Labortechnik GmbH, Seelbach
Zellzähler (CASY® TT)	Innovatis AG (CASY-Technologie), Reutlingen
Zentrifugen	
Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischzentrifuge Jouan (CR4.22)	Jouan GmbH, Hanau

7.4 Arbeitsmittel

Deckgläser (24x24 mm, 70x24 mm)	Fisher Scientific, Schwerte
Falconröhrchen (Cellstar)	Greiner bio- One, Frickenhausen
Einmalspritzen Norm-Ject (5-10 ml)	Henke, Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Einmal-Kanülen	Henke, Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Handstückzähler	Carl Roth, Karlsruhe
Homogenisierungsbeutel	Seward, Norfolk, UK
Mehrkanal-Luftpolsterpipette (Transferpette 8)	Fisher Scientific, Schwerte
Metallbox (für Eiskühlung)	Fisher Scientific, Schwerte
Mikrotiterplatten (96-well)	Nunc GmbH&Co, Wiesbaden
Pipetten (Research)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen	Fisher Scientific, Schwerte
Pipettierhilfe (accu-jet)	Brand GmbH & Co, Wertheim
Pipettierhilfe (pipetus®- accu)	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt
Objektträger (geschliffen, 26 x 76 mm)	Menzel, Braunschweig
Reaktionsgefäße (1,5 ml Caps)	Brand GmbH & Co, Wertheim
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorff-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm), MCE	Fisherbrand, Irland
Sterilfilter (0,45 µm), MCE	Fisherbrand, Irland
Wägebapier	NeoLab, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75cm ²)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellzählkammer nach NEUBAUER	Fisher Scientific, Schwerte

7.5 Chemikalien und Reagenzien

Agarose, Seakem HGT (normal melting)	Biozym Diagnostics, Hameln
Agarose Sea Plaque GTG (low melting)	Biozym Diagnostics, Hameln
4, 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Cell Titer Blue® Reagenz	Promega GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Fermentationsgasgemisch	Linde Gas AG, Leuna
Gallensalze (bile salt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Hämin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Mucin	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Fisher Scientific, Schwerte
Natriumhypochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ochsengalle	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Pancreatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Peptonwasser	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Phenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Salzsäure (HCl, 2 N- Lösung)	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
SYBR-Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 80	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

7.6 Lösungen und Puffer

Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin (10,25 g/ml in 0,9 % NaCl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Versene (0,2 g/l isotonische NaCl-Lösung)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

HT29 Wachstumsmedium

450 ml	DMEM
50 ml	FCS

Phosphate Buffered Saline (PBS)

8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
pH 7,4; autoklaviert	

PBS (+ Ca²⁺ + Mg²⁺)

8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
0,1 g/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
0,13 g/l	MgCl ₂ x 6 H ₂ O

pH 7,3; sterilfiltriert

Trypsin-Versen-Lösung

11 ml	Trypsin [10 x] 25 g/l in physiologischer Kochsalzlösung
100 ml	Versen [1 x] 0,2 g/l in physiologischer Kochsalzlösung

0,2 M Na₂EDTA-Stammlösung

74,4 g	Na ₂ EDTA
1 l	Aqua bidest.

Proliferations-Assay**DAPI-Stammlösung**

0,3 mM DAPI

in Methanol

Lagerung: dunkel bei -20 °C

DAPI-Gebrauchslösung

0,02 mM DAPI-Stammlösung

in PBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺)

frisch ansetzen, vor Licht schützen

Ammoniakbestimmung

Lösung A

1 g Phenol
5 mg Na-Nitroprussid

Lösung B

0,5 g NaOH
0,04 g Na-Hypochlorid

Comet Assay

0,5 % Normal-Melting-Agarose (NMA)

150 mg NMA

in 30 ml PBS im Mikrowellenherd durch aufkochen lösen;

Verwendung: im Wasserbad bei 60 °C; Lagerung bei 4 °C

0,7 % Low-Melting-Agarose (LMA)

210 mg LMA

in 30 ml PBS im Mikrowellenherd durch aufkochen lösen;

Verwendung: im Wasserbad bei 37 °C; Lagerung bei 4 °C

NaOH-Stammlösung (10 M)

400 g NaOH-Plätzchen

1 l Aqua bidest.

Na₂EDTA-Stammlösung (200 mM)

74,4 g Na₂EDTA

1 l Aqua bidest.

Elektrophorese-Puffer

60 ml NaOH Stammlösung (10 M)

10 ml Na₂EDTA-Stammlösung (200 mM)

mit Aqua bidest. auf 2 l auffüllen;

vor Gebrauch frisch herstellen und bis zur Verwendung bei 4 °C lagern

Lyse-Stammlösung

146,1 g NaCl

37,2 g Na₂EDTA

1,2 g Tris

8 g NaOH-Plätzchen

10 g N-Lauroylsarcosin

1 l Aqua bidest.

Lagerung: RT

Lyse-Gebrauchslösung

356 ml Lyse-Stammlösung

40 ml DMSO

4 ml Triton X-100

vor Gebrauch frisch herstellen und bis zur Verwendung bei 4 °C lagern

Neutralisationspuffer

48,5 g/l Tris-Base [0,4 M]

in Aqua bidest. lösen ; pH 7,5; autoklaviert; Lagerung: RT

Antifade-Puffer

2,5 g DABCO

50 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8)

50 ml Glycerol

Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt

SYBR®-Green-Gebrauchslösung [1:1000]

1 µl SYBR®-Green-Farbstoff (Lagerung -20 °C)

999 µl Antifade-Puffer

Lagerung bei - 20 °C; lichtgeschützt

7.7 Software

GraphPad PRISM™

GraphPad Software Incorporated,
SanDiego, USA

Kinetic Imaging Komet 4.0

Kinetic Imaging LTD., Liverpool, UK

Microsoft Office XP für Windows

Microsoft Corporation, USA

X-Fluor™

Tecan AG, Crailsheim

7.8 Technische Daten der SCFA- & GS-Quantifizierung

Tabelle 7-4: Technische Daten der GC (SCFA-Quantifizierung)


GC	Typ 17A-Shimadzu/Autoinjektor AOC-20i
Säule	FFAP Länge: 15 m Innerer Durchmesser: 0,25 mm Filmdicke: 0,25 µm
Trärgas	H ₂ 0, 78 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Injektionsmodus	Split (1:100)
Injektion	250 °C
Druck	24 kPa
Säulenofen	Temperaturprogramm: 105 °C 1,5 min; 105 °C  170 °C mit 35 °C/ min; 170 °C min
Detektor	FID (Flammenionisationsdetektor)

Tabelle 7-5: Technische Daten der GC-MS (GS-Quantifizierung)

GC-MS-SIM	GC17-QP5000 (Shimadzu)
Säule	ZB-5ms Guardian Länge: 30 m Innerer Durchmesser: 0,25 mm Filmdicke: 0,25 µm
Trägergas	Helium, 43,4 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Injektionsmodus	Split (1:50)
Injektion	280 °C
Druck	90,4 kPa (Column Inlet Pressure)
Säulenofen	Temperaturprogramm: 150°C 5 min; 240°C ⌚ mit 40°C/ min; 255°C ⌚ n 1°C/ min; 270°C ⌚ mit 4°C/ min; 278°C ⌚ mit 1°C/ min, 278°C min
Detektor	Massenspektrometer (GC-MS-QP5000, total ion current)

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Fertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt...

... allem voran Frau Prof.Dr.Beatrice L.Pool-Zobel, die mir die Möglichkeit eröffnete, selbständig an diesem interessanten Thema zu arbeiten.

... Herrn PD Dr. Michael Glej, der mich während der letzten Monate hervorragend betreute und sich Zeit für alle meine Fragen nahm.

... Thomas Hofmann, der mir als Betreuer auch in größten Stresssituationen mit vollem Einsatz und Kompetenz zur Seite stand.

... Julia Sauer, die mir sowohl bei der Bearbeitung meiner Diplomarbeit als auch im Rahmen des Wahlpflichtfaches "molekulare Ernährungsforschung" eine Vielzahl von Laborpraktiken eröffnete.

... allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Ernährungstoxikologie, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und zugleich für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten.

... Prof.Dr.Jahreis, Herrn Möckel und Dr.Sylvia Keller, die mir die Messung der Fett- und Gallensäurekonzentrationen meiner Proben ermöglichten.

... allen anderen Dozenten meiner Studienlaufbahn, ohne deren Vermittlung eines stabilen Basiswissens es mir nicht möglich gewesen wäre, ein fundiertes Spezialwissen aufzubauen.

Ebenfalls dankend erwähnen möchte ich all meine Freunde, meine Familie und vor allem meine Eltern. Ohne ihre Hilfe und Unterstützung in den letzten Jahren wäre dieses Studium nicht möglich gewesen.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jena, Juli 2007

Axel Weber